

200400754A

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

免疫抑制性ネットワークを介した炎症性神経疾患の
画期的な治療法開発に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山村 隆

平成17年(2005)3月

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

免疫抑制性ネットワークを介した炎症性神経疾患の
画期的な治療法開発に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山村 隆

平成17年（2005）3月

目 次

I. 総括研究報告	
■ 免疫抑制性ネットワークを介した炎症性神経疾患の 画期的な治療法開発に関する研究 1
国立精神・神経センター神経研究所 山村 隆	
II. 分担研究報告	
■ 「V α 19J α 33T 細胞を標的とした治療法開発」に関する研究 14
国立精神・神経センター神経研究所 三宅 幸子	
■ 「V α 19- J α 33NKT 細胞を標的とした自己免疫性 神経疾患治療法開発のための基礎研究」 20
三菱化学生命科学研究所 島村 道夫	
■ MR1 拘束性 T 細胞を標的とする新規糖脂質療法 開発に関する研究 26
国立精神・神経センター神経研究所 山村 隆	
■ ヒト末梢神経におけるタイトジャンクション関連蛋白の発現： 生検腓腹神経を用いた免疫組織化学的検討 35
山口大学医学部脳神経病態学神経内科 神田 隆	
■ 多発性硬化症脱髄巣反応性アストロサイトにおける Nogo 受容体の発現 39
国立精神・神経センター神経研究所 佐藤 準一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 46
IV. 研究成果の刊行物・別刷 49

I. 総括研究報告

免疫抑制性ネットワークを介した炎症性神経疾患の
画期的な治療法開発に関する研究

主任研究者 山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所
疾病研究第六部 部長

研究要旨

本研究プロジェクトでは、多発性硬化症などの中枢神経系炎症性疾患に対する新しい治療法を開発するために、糖脂質やペプチドを認識する免疫調節細胞や、中枢神経再生の制御に関わる分子などに関する基盤研究を進めている。本年度は、新しい免疫調節細胞として注目されている $V\alpha 19-J\alpha 33$ invariant T細胞（第二の NKT 細胞）が、自己免疫性炎症の制御に関わることを、動物実験により世界に先駆けて証明することに成功した。すなわち、“第二の NKT 細胞”を過剰発現する T 細胞抗原受容体トランスジェニックマウスは、実験的自己免疫性脳炎(EAE)誘導に対して抵抗性を示すことや、“第二の NKT 細胞”の認識する糖脂質リガンドの一部に、EAE に対する治療活性のあることを証明した。第二の NKT 細胞は、炎症性神経疾患の病態制御において重要な役割を果たし、治療法開発の標的として重要である。

分担研究者

島村道夫（三菱化学生命科学研究所発生免疫研究ユニットリーダー）

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）

佐藤準一（国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部室長）

神田隆（山口大学医学部脳神経病態学神経内科教授）

自己組織に対する異常な免疫応答を介して発病する自己免疫疾患と考えられている。MS に対するインターフェロンベータ療法や CIDP に対する IVIG 療法の有効性は証明されているものの、現在でも治療に難渋する症例が多い。その予後を改善するには、まったく新しい治療戦略が必要である。幸いにも、自己免疫疾患の発症や制御に関する基礎免疫学の知見は急速に増大しており、免疫学の理論に基づく合理的な治療法開発へ手がかりが得られつつある。本研究では、生体内炎症を抑制する調節性 T 細胞、免疫抑制受容体、それらの形成するネットワークな

A. 研究目的

多発性硬化症（MS）や慢性炎症性脱髄性神経炎（CIDP）などの神経免疫疾患は、

どについて基盤研究を進め、その成果を利用して画期的な炎症制御法を開発することを目指している。また、炎症が回復したあとに現れる中枢神経内のグリア細胞反応は、神経再生に影響して患者の予後を左右する。そこで、グリア細胞反応を適切に制御する方法の開発も、プロジェクトの一部に組み込んでいる。

主任研究者らは既に、CD1d 分子に拘束された NKT 細胞（古典的 NKT 細胞）を活性化する糖脂質リガンド OCH を開発し、OCH が MS の動物モデルを抑制することを示した（Nature 413: 531, 2001）。しかし、OCH では制御することが難しいような炎症病態も存在する。

本プロジェクトで特に重点的に取り組んでいるのは、1) 最近日本とフランスで同時に発見され、CD1d ではなく別の class Ib 分子（MR1 分子）に拘束される、V α 19-J α 33 調節性 T 細胞（第二の NKT 細胞）を標的とした治療法の開発、2) 自己抗原ペプチドによる免疫制御法の開発、および 3) グリア細胞を標的とする組織修復法の開発である。初年度に「第二の NKT 細胞」の解析に有用なシステム（トランスジェニックマウス、糖脂質リガンド）を確立したので、本年度は、第二の NKT 細胞が自己免疫性炎症の制御に重要な役割を果たす可能性について、実験的な証明を試みた。その結果、この新しい NKT 細胞が免疫制御性ネットワークの中で、中心的な位置に存在することを、世界に先駆けて示すことができた

（論文準備中）。

フランスの Lantz らは、「第二の NKT 細胞」が腸管粘膜固有相に集積し、腸管免疫の制御に重要な役割を果たす可能性を示唆した（Nature 422:164, 2003）。しかし、本研究プロジェクトによって、「第二の NKT 細胞」は、腸管免疫の制御に限らず、自己免疫応答の制御において重要な役割を果たすという事実が明らかになった。「第二の NKT 細胞」は、腸内細菌のない環境では著明に減少する。近年のアレルギー疾患や自己免疫疾患の患者数の増加と、食生活の変化や抗生物質の乱用を結びつける意見もあるが、「第二の NKT 細胞」は問題解決の鍵を握る可能性がある。このように、基礎免疫学、臨床免疫学、神経免疫学などにおいて、重要な研究領域を開拓しつつあるものと自負している。

B. 研究方法

B6 マウスと B6 背景を有する遺伝子改変マウスを用いて実験を行った。EAE の誘導には、MOG35-55 ペプチドをフロイント・アジュバントとともに、マウスの皮下に免疫した。感作後 10-12 日後に感作リンパ節を摘出し、細胞増殖反応およびサイトカイン産生能を評価した。細胞増殖は通常の子ミジンの取り込みを測定する方法により、サイトカインの測定には、ELISA 法または Cytometric Beads Array (CBA)を用いた。

第二の NKT 細胞の解析を容易にする

ために、インバリアント V α 19-J α 33 TCR alpha 鎖を発現するトランスジェニックマウスを作成した。トランスジーンは B6 マウス、TCR アルファ鎖を欠損するマウス、および NOD マウスの受精卵に導入した。さらに、V α 14 NKT 細胞を発現せず、第二の NKT 細胞だけを発現するマウスを作成するために、B6 背景の V α 19-Tg を CD1d ノックアウトマウスに交配した。さらに第二の NKT 細胞を種々の糖脂質で刺激し、それぞれのサイトカイン誘導能を ELISA 法で評価し、糖脂質リガンドの候補物質を探索した。アルファ・マンノシルセラミドに第二の NKT 細胞を刺激する活性が存在することが示唆されたので、そのアナログを作成し、EAE の治療効果を検定した。

C. 研究結果

本研究代表者は、「第二の NKT 細胞」（ヒトでは V α 7.2-J α 33 TCR を発現）が MS の脳病変や CIDP の末梢神経病変に多数浸潤していることを世界で最初に示し (Int. Immunol. 16:223, 2004)、このリンパ球が自己免疫性炎症の病態に何らかの役割を果たすことを示唆した。しかし、「第二の NKT 細胞」が炎症の抑制に貢献するのか、あるいは炎症の増悪に関与するのかは不明であった。ヒトの疾患材料を扱う限りにおいて、現在の技術では、この質問に答えることは不可能と考えた。そこで、動物実験によるアプローチを試みた。島村の確立した「第二の NKT

細胞」を過剰発現する V α 19-J α 33 invariant TCR トランスジェニックマウス (B6-wild 背景または CD1d KO 背景) を用いて、同マウスが EAE 抵抗性であるか、あるいは EAE 好発系であるかを調べることにした (三宅担当)。研究の結果、V α 19-J α 33 TCR を過剰発現したトランスジェニックマウスでは、EAE の臨床スコアの最大値が有意に低いことがわかった。また、CD1d KO マウスにおいても、V α 19-J α 33 TCR の過剰発現は、EAE 臨床像の軽症化をもたらした。EAE の軽症化は、同時に MOG 反応性 T 細胞の Th2 偏倚を伴っていることが、サイトカイン産生能や MOG 特異的 Ig アイソタイプの評価によって明らかにされた。しかし、トランスジェニックマウスにおける MOG 反応性 T 細胞の増殖反応は正常であり、これらの結果から、「第二の NKT 細胞」が EAE の発症を抑制する調節細胞として機能することが推測された。

初年度において、島村は「第二の NKT 細胞」を刺激するリガンドとしてアルファ・ガラクトシルセラミドおよびアルファ・マンノシルセラミド (α -ManCer) を同定していた。本年度は α -ManCer のセラミド部位の構造変換体 (アナログ) を合成し、その免疫活性を検討した (島村)。その結果、 α -ManCer に比較して、より Th1 サイトカインの分泌増強の明らかアナログ、Th1 サイトカインを増強させる物質、および Th1、Th2 両サイトカインの分泌を増強させるアナログを同

定した。一連の結果は、糖脂質による免疫制御法の開発につながるものである。

α -ManCer のアナログによる EAE 治療実験も興味ある結果をもたらした。山村と三宅は、野生型 B6 マウスに MOG35-55 で EAE を誘導し、感作当日にアナログを腹腔内投与する実験系を組んだ。EAE 抑制活性を検討した 4 種類のアナログのうち、1 種類のアナログについては、EAE の発症を著明に抑制する活性のあることがわかった。EAE 発症の抑制されたマウスでは、MOG 感作リンパ球による MOG 特異的インターフェロンガンマ産生が顕著に抑制され、Th2 偏倚の傾向が観察された (山村)。トランスジェニックマウスの結果とあわせて、一連の実験結果は、MR1 に拘束された第二の NKT 細胞が炎症制御性に働き、同細胞を刺激する糖脂質の中に治療薬として有望なものが存在する可能性を示すものと考えられる。

“第二の NKT 細胞” 以外の研究については、神田は血液神経関門の分子メカニズムに関連した研究を進めている。本年度は、ヒト末梢神経における tight junction 関連蛋白の発現に注目し、claudin-5 や ZO-1 が血液神経関門の形成に重要であることを示した。

佐藤は MS の脱髄病変のグリア細胞を研究対象とし、神経病理学的なアプローチを進めている。昨年度は、反応性アストロサイトに、14-3-3 蛋白の *epsilon* form が強く発現していることを発見し

た。本年は、反応性アストロサイトやミクログリアに Nogo 受容体の発現が見られることを報告した。これまでの理解では、オリゴデンドロサイトの発現する Nogo が、ニューロンの発現する Nogo 受容体に結合して、神経細胞の伸長を抑制する機構が考えられている。しかし、今回の佐藤の発見は、MS の脱髄巣において、アストロサイトやミクログリアの発現する Nogo 受容体が、decoy 受容体として、オリゴデンドロサイト上の Nogo-A と反応する可能性を示している。

D. 考察

「第二の NKT 細胞」を過剰発現するトランスジェニックマウスで EAE の発症が抑制されることや、「第二の NKT 細胞」の糖脂質リガンドで EAE を治療できることが証明され、日仏で発見された新しいリンパ球が自己免疫性炎症の抑制細胞として機能することがわかった。

NKT 細胞は NK 細胞マーカーを発現する T 細胞を指すこともあるが、近年では monomorphic な MHC クラス I 様分子に拘束され、TCR にインバリアント鎖を発現する細胞に限って NKT 細胞と命名することが一般になっている。古典的な NKT 細胞 (第一の NKT) は、MHC クラス I 様の CD1d 分子に結合した糖脂質を認識する細胞であり、マウスでは TCR アルファ鎖に V α 14-J α 18 インバリアント鎖を発現する。一方、我々が研究を進めている、新しい NKT 細胞は、MR1

分子に結合した糖脂質を認識し、マウスでは TCR アルファ鎖に V α 19-J α 33 インバリエント鎖を発現する細胞である。発見が遅れたために、仮に「第二」の NKT 細胞と命名しているが、ヒトの末梢血では「第一」の NKT 細胞よりも数が多く、より重要な細胞である可能性がある。

第二の NKT 細胞は腸管粘膜に多いことが報告されている。また、germ-free の条件では、細胞数が極端に減少することも証明されており、腸内細菌叢によって影響を受けるきわめてユニークな細胞集団と考えられている。衛生環境と自己免疫発症の関連が示唆され (Hygiene hypothesis)、食生活の変化や抗生物質の乱用と免疫疾患の増加を関連づける報告も数多く見られる。MS に限って言えば、過去 30 年間に症例数が倍増し、また病型が視神経脊髄病変の主体とする opticospinal MS から、欧米人型の MS (大脳病変主体) に変化している。このような環境因子の変化と疾患像の変化を関連づける理論は未成熟であるが、我々は「第二の NKT 細胞」が鍵を握る細胞ではないかと考えている。

日本人のライフスタイルの変化により、腸内細菌叢が変化し、その結果第二の NKT 細胞の数や機能に変調が現れている可能性はないであろうか？もしそうであれば、糖脂質リガンドでその変調を矯正するような治療法が有効かもしれない。第二の NKT 細胞の研究は、現代のもっとも重要な研究テーマとしてクローズア

ップされてきたと考えられる。

糖脂質リガンドによる EAE の治療実験において、糖脂質の効果が本当に「第二の NKT 細胞」を介したものであるか、確認する作業が不可欠である。その目的を達成するために、最近米国の研究者から MR1 欠損マウスを入手した。最終年度には、MR1 KO マウスに EAE を誘導し、最後の詰めの実験を行う予定である。

中枢神経炎症の結果として生じる病理変化のうち、脱髄病変が再生することは広く知られているが、神経細胞についても、状況が整えば再生機転が見られることが注目されている。神経細胞の再生機転を制御する分子間相互作用として、Nogo と Nogo 重要体の相互作用が重要である。本年度は、Nogo 受容体が、ニューロンに限らず、反応性アストロサイトやミクログリアにも発現することを示した (佐藤担当)。

E. 結論

MR1 分子に拘束される NKT 細胞 (第二の NKT 細胞) は、自己免疫疾患の病変部位に選択的に浸潤する。動物実験の結果、この細胞は EAE の発症に抑制的に働き、炎症の制御に関与することが明らかになった。第二の NKT 細胞の糖脂質リガンドの中には、EAE に対する顕著な治療効果を示すものがあることを示した。このリガンドは、MS や CIDP に対する新たな治療薬として発展する可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Oki, S., A. Chiba, T. Yamamura and S. Miyake: The clinical implication and molecular mechanism of preferential IL-4 production by modified glycolipid-stimulated NKT cells. *J. Clin. Invest.* 113: 1631-1640, 2004

Satoh, J-i., T. Yamamura, and K. Arima: The 14-3-3 protein ϵ isoform, expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple sclerosis binds to vimentin and glial fibrillary acidic protein in cultured human astrocytes. *Am. J. Pathol.* 165: 577-592, 2004

Rosen, D.B., M. Araki, J.A. Hamerman, T. Chen, T. Yamamura and L.L. Lanier: A structural basis for the association of DAP12 with mouse, but not human, NKG2D. *J. Immunol.* 173: 2470-2478, 2004

Takahashi, K., T. Aranami, M. Endoh, S. Miyake, and T. Yamamura: The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain* 127: 1917-1927, 2004

Nakai, Y., K. Iwabuchi, S. Fujii, N. Ishimori, N. Dashtsoodol, K. Watano, T. Mishima, C. Iwabuchi, S. Tanaka, J.S.

Bezbradica, T. Nakayama, M. Taniguchi, S. Miyake, T. Yamamura, A. Kitabatake, S. Joyce, L. Van Kaer, and K. Onoe: Natural killer T cells accelerate atherogenesis in mice. *Blood* 104: 2051-2059, 2004

Mizuno, M., M. Masumura, C. Tomi, A. Chiba, S. Oki, T. Yamamura and S. Miyake: Synthetic glycolipid OCH prevents insulinitis and diabetes in NOD mice. *J. Autoimmun.* 23:293-300, 2004

Hashimoto, D., S. Asakura, S. Miyake, T. Yamamura, L. Van Kaer, C. Liu, M. Tanimoto, and T. Teshima: Stimulation of host natural killer T cells by synthetic glycolipid regulates acute graft-versus-host disease by inducing Th2 polarization of donor T cells. *J. Immunol.* 174: 551-556, 2005

Ueno, Y., S. Tanaka, M. Sumii, S. Miyake, S. Tazuma, M. Taniguchi, T. Yamamura and K. Chayama: Single dose of OCH improves mucosal T helper type 1/T helper type 2 cytokine balance and prevents experimental colitis in the presence of Va14 natural killer T cells in mice. *Inflamm. Bowel Dis.* 11:35-41, 2005

Satoh, J-i., and T. Yamamura: Gene expression profile following stable expression of the cellular prion protein. *Cell. Mol. Neurobiol.* 24:793-814, 2004

Yu, K.O.A., J.S. Im, A. Molano, Y.

- Dutronec, P.A. Illarionov, C. Forestier, N. Fujiwara, I. Arias, S. Miyake, T. Yamamura, Y-T. Chang, G.S. Besra, and S.A. Porcelli: Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of α -galactosylceramides. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3383-3388, 2005
- Satoh, J-i., M. Nakanishi, F. Koike, S. Miyake, T. Yamamoto, M. Kawai, S. Kukuchi, K. Nomura, K. Yokoyama, K. Ota, T. Kanda, T. Fukazawa and T. Yamamura: Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. *Neurobiol. Dis.* (in press), 2005
- Shimamura, M., K. Kobayashi, H. Watanabe, Y.-Y. Huang, N. Okamoto, O. Kanie, H. Goji, and M. Kobayashi: Generation of V α 14 NKT cells in vitro from hematopoietic precursors residing in bone marrow and peripheral blood. *Eur. J. Immunol.* 34: 735-742, 2004
- Kanda, T., Y. Numata, and H. Mizusawa: Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: decreased claudin-5 and relocated ZO-1. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75: 765-769, 2004
- Kanda, T., T. Ariga, H. Kubodera, H.L. Jin, K. Owada, T. Kasama, M. Yamawaki, and H. Mizusawa: Glycosphingolipid composition of primary cultured human brain microvascular endothelial cells. *J. Neurosci. Res.* 78: 141-150, 2004
- Hori, S., S. Ohtsuki, M. Ichinowatari, T. Yokota, T. Kanda, and T. Terasaki: Selective gene silencing of rat ATP-binding cassette G2 transporter in an in vitro blood-brain barrier model by short interfering RNA. *J. Neurochem.* (in press) 2005
- Maraganore, D.M., T.G. Lesnick, A. Elbaz, M.-C. Chartier-Harlin, T. Gasser, R. Kruger, N. Hattori, G.D. Mellick, A. Quattrone, J. Satoh, T. Toda, J. Wang, J.P.A. Ionnidis, M. de Andrade, and W.A. Rocca. the UCHL1 Global Genetics Consortium: UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann. Neurol.* 55: 512-521, 2004
- Yakushiji, Y., J. Satoh, M. Yukitake, K. Yamamuchi, I. Nakamura, I. Nishino, and Y. Kuroda: interferon β -responsive inclusion body myositis in a hepatitis C virus carrier. *Neurology* 63: 587-588, 2004
- 山村 隆 : NKT 細胞のリガンドと Th1/Th2 バランス. 臨床免疫 41: 14-17, 2004
- 宮本 勝一, 山村 隆 : 多発性硬化症の新しい治療薬の開発. Clinical Neuroscience 22: 847-850, 2004

山村 隆：MS FRONTIER. 多発性硬化症の DNA マイクロアレイ解析. Current Insights in Neurological Science. Vol 12, No. 3, pp 10-11, 2004

佐藤 準一、山村 隆： サイトカインの生理活性-神経系. Overview. 別冊・医学のあゆみ. サイトカイン -state of arts. (編集 宮坂 信之、宮島 篤), 医歯薬出版(東京), pp 119-122, 2004

宮本 勝一、山村 隆： サイトカインの病態への関与. 多発性硬化症. 別冊・医学のあゆみ. サイトカイン -state of arts. (編集 宮坂 信之、宮島 篤), 医歯薬出版(東京), pp 245-247, 2004

山村 隆、高橋 和也、荒木 学：多発性硬化症と免疫調節細胞. 日本臨床 2005 年増刊. 臨床免疫学(下)-基礎研究の進歩と最新の臨床- (印刷中)

山村 隆：多発性硬化症における免疫抑制薬の使い方:神経免疫疾患. 最新医学(印刷中), 2005

三宅 幸子:NKT細胞と自己免疫疾患. 内科 93: 213-216, 2004

三宅 幸子：免疫制御細胞と自己免疫疾患. Mol. Med. 41: 177-182, 2004

三宅 幸子：ナチュラルキラーT細胞を標的とした多発性硬化症の糖脂質治療. 医学のあゆみ 208: 449-453, 2004

三宅 幸子：NKT細胞の機能改変を目指した変異リガンド. 現代医療 36: 113-143, 2004

三宅 幸子：Cbl ファミリーと自己免疫. 分子リウマチ 1: 16-22, 2004

大木 伸司、三宅 幸子：ナイーブ T細胞の共刺激における LFA-1 の作用機序. 臨床免疫 42: 375-378, 2004

三宅 幸子：自己免疫疾患と細胞性免疫. MEDICO 35: 9-11, 2004

三宅 幸子:NKT細胞と自己免疫疾患. 医学のあゆみ 211: 715-720, 2004

千葉 麻子、三宅 幸子：NKT細胞を標的とした関節炎治療法の開発. リウマチ科 (印刷中)

三宅 幸子：NKT細胞からの TH2 サイトカイン産生を誘導する合成糖脂質. 臨床免疫 42: 202-205, 2004

三宅 幸子：NKT細胞を標的とした自己免疫疾患治療法. アレルギー科 18: 467-475, 2004

神田 隆：血液脳関門の機能. 日本医事新報 4164: 107-108, 2004

神田 隆：脳血管性痴呆の特殊型. Sneddon 症候群. 日本臨床 62: Suppl. 4, 192-195, 2004

神田 隆：アルコール性ニューロパチー.

Brain Medical 16: 249-253, 2004

石橋 哲、神田 隆：多発性硬化症の鑑別診断. モダンフィジシャン 24: 1856-1859, 2004

佐藤 準一、山村 隆：多発性硬化症におけるインターフェロンベータ応答遺伝子. Bio Medical Quick Review Net 2004

佐藤 準一：特集 II. 疾患モデルにおける最新の知見「自己免疫性脳脊髄炎」Neuroimmunology 12: 151-161, 2004

2. 学会発表

Satoh, J-i., M. Nakanishi, and T. Yamamura: Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis-regulatory genes in multiple sclerosis. American Academy of Neurology meeting, San Francisco, April 27, 2004

Masumura, M., S. Miyake, K. Miyamoto, M. Mizuno, and T. Yamamura: A new synthetic glycolipid OCH suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by inducing Th2 bias of natural killer (NK) T cells. American Academy of Neurology meeting, San Francisco, April 27, 2004

Chen, J., B.P. Vistica, S. Miyake, T. Yamamura, C-C. Chan, and I. Gery: The synthetic glycolipid "OCH", a stimulant of NKT cells, inhibits Th1 cell-mediated ocular inflammation, but enhances disease

induced by Th2 cells. 2004 ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting, Fort Lauderdale, Florida, USA, April 25, 2004

Satoh, J-i., M. Nakanishi and T. Yamamura: Dysregulation of apoptosis-regulatory genes in multiple sclerosis. 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS. Motreal, Quebec, Canada, July 18-23, 2004

Oki, S., A. Chiba, T. Yamamura, and S. Miyake: The molecular mechanisms of preferential IL-4 production by modified glycolipid-stimulated NKT cells. 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS. Motreal, Quebec, Canada, July 18-23, 2004

Nakanishi M, Satoh J-I, Aranami T, and Yamamura T: Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in apolipoprotein E-knockout mice. 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS. July 21, 2004. Montreal, Canada

Hermann, T., O. Naidenko, S. Miyake, T. Yamamura, S. Cardell, M. Kronenberg, and E. Pyz: CD1d/NKTinv interaction sites revealed by analysis of ligand recognition across a species barrier. The

Third International Workshop on NKT cells & CD1-mediated antigen presentation. Heron Island, Australia. September 10, 2004

Oki, S., M. Mizuno, C. Tomi, T. Yamamura, and S. Miyake: Molecular basis of NKT cell aptitude as primary source of cytokine production for regulation of immune responses in vivo. The Third International Workshop on NKT cells & CD1-mediated antigen presentation. Heron Island, Australia. September 10, 2004

Satoh, J.-i., M. Nakanishi, H. Onoue, T. Aranami, and T. Yamamura: T cell gene expression profiling identifies molecularly and clinically distinct subgroups of multiple sclerosis. The VIIth International Congress of Neuroimmunology. Venice, Italy, September 29, 2004

Bedoui, S., S. Miyake, Y. Lin, K. Miyamoto, S. Oki, N. Kawamura, A. Beck-Sickinger, S. von Hoersten, and T. Yamamura: Activation of the neuropeptide Y (NPY) Y1 receptor suppresses EAE via the inhibition of autoreactive Th1 responses in vivo. The VIIth International Congress of Neuroimmunology. Venice, Italy, September 29, 2004

Lin, Y., S. Miyake and T. Yamamura: An

encephalogenic proteolipid protein (PLP) peptide PLP136-150 induces regulatory cells in the lymph node and thus inhibits re-induction of EAE. The VIIth International Congress of Neuroimmunology. Venice, Italy, September 29, 2004

Nakanishi, M., J.-I. Satoh, T. Aranami, G. Hirose, and T. Yamamura: lack of apolipoprotein E (Apo E) exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. The VIIth International Congress of Neuroimmunology. Venice, Italy, September 30, 2004

Croxford, J.L. and T. Yamamura: Immunoregulation of a model of multiple sclerosis using the synthetic cannabinoid R(+) WIN55,212. The VIIth International Congress of Neuroimmunology. Venice, Italy, September 30, 2004

Theil, M.M., S. Miyake, H. Hosoda, J. Schween, J.L. Croxford, A. Chiba, S. Oki, S. von Horsten, T. Akamizu, K. Kangawa, and T. Yamamura: Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by gastric hormone Ghrelin. The VIIth International Congress of Neuroimmunology. Venice, Italy, September 30, 2004

Chiba, A., S. Kaieda, S. Oki, T. Yamamura and S. Miyake: The critical

role of NKT cells in the pathogenesis of collagen-induced arthritis and antibody-induced arthritis. ACR/ARHP Annual Scientific meeting. San Antonio, Texas, USA, October 18, 2004

Yamamura T. Altered glycolipid ligands for NKT cells. Symposium "Non classical MHC/CD1 recognition", The 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS, Montreal, Canada, July 22, 2004

山村 隆 : 免疫調節と neuropeptide Y. 第 54 回日本アレルギー学会総会シンポジウム I、横浜, 2004 年 11 月 4 日

Yamamura, T. Invariant T cells and multiple sclerosis/EAE. International Immunology Symposium Series 2004, Immune Regulation & Immunogenetics, Shanghai Second Medical University, Shanghai, Nov. 17, 2004

Chiba, A., T. Yamamura and S. Miyake: A modified glycolipid ligand, OCH, suppresses collagen-induced arthritis by inducing Th2 bias of natural killer (NK) T cells. Recent progress in Neuroimmunology and NKT cell research. Special symposium supported by Japan MS Society. Tokyo, March 9, 2004

Miyake, S., A. Chiba, T. Yamamura, and S. Oki: The clinical implication and molecular mechanism of preferential IL-4

production by modified glycolipid-stimulated NKT cells. Recent progress in Neuroimmunology and NKT cell research. Special symposium supported by Japan MS Society. Tokyo, March 9, 2004

Yamamura, T.: Invariant T cells in multiple sclerosis. Recent progress in Neuroimmunology and NKT cell research. Special symposium supported by Japan MS Society. Tokyo, March 9, 2004

Yamamura, T.: V α 7.2 invariant T cells in multiple sclerosis. The Third International Workshop on NKT cells & CD1-mediated antigen presentation. Heron Island, Australia. September 11, 2004

Takeda, K., Y. Ikarashi, S. Miyake, T. Yamamura, H. Wakasugi, M. Kronenberg, and K. Okumura: Modulation of iNKT cell responses by their specific ligands. The Third International Workshop on NKT cells & CD1-mediated antigen presentation. Heron Island, Australia. September 9, 2004

Miyake, S., A. Chiba, T. Yamamura, and S. Oki: The molecular basis of preferential IL-4 production by OCH-stimulated NKT cells. The Third International Workshop on NKT cells & CD1-mediated antigen presentation. Heron Island, Australia. September 9, 2004

II. 分担研究報告

厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

「Vα19Jα33T 細胞を標的とした治療法開発」に関する研究

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

研究要旨

Vα19Jα33T 細胞は、可変性の限られた T 細胞受容体を有し、活性化マーカーを持ち、炎症病変に集積してサイトカインを産生するユニークなリンパ球である。Vα19Jα33T 細胞は MHC クラス Ib に属する MR1 分子に結合した脂質を認識することが想定されているが、其の生理機能は不明である。そこで本年は、Vα19Jα33T 細胞受容体のトランスジェニックマウスを用いて、実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルにおける Vα19Jα33T 細胞の役割について検討した。Vα19Jα33 トランスジェニックマウス、もしくは Vα19Jα33 トランスジェニック/CD1 ノックアウトマウスでは、EAE の重症度がコントロール群に比較して有意に軽症であった。また、MOG 反応性 T 細胞の Th2 偏倚がみられ、Vα19Jα33T 細胞は抗原特異的 T 細胞の Th2 分化を促進することによって EAE を抑制することが明らかとなった。

A. 研究目的

これまで我々は、Vα14NKT 細胞を刺激して、Th2 サイトカインを選択的に産生させる糖脂質 OCH を合成し、OCH が EAE を抑制することを示し、免疫制御細胞が多発性硬化症等の免疫性疾患の治療の標的になることを明らかにしてきた。Vα19Jα33T 細胞は、半可変性の T 細胞受容体を持ち、オリゴクローナルに増殖しており、刺激によりすみやかにサイトカインを産生する点が Vα14NKT 細胞に類似していることから、免疫疾患の治療標的になると可能性がある。昨年から、Vα19Jα33T 細胞を刺激し増殖反応・サイトカイン産生がみられる合成糖脂質の中で、実験的自己免疫性脳脊髄炎（Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: EAE）の治療効果のあるものの

スクリーニングを開始したところである。一方、Vα19Jα33T 細胞の自己免疫病態における役割についてはいまだ不明であり、その解明は Vα19Jα33T 細胞を治療標的と考える場合に大変重要である。そこで、本年度は Vα19Jα33 トランスジェニックマウスを用いて、EAE の病態を解析し、自己免疫病態における Vα19Jα33T 細胞の機能について検討する。

B. 研究方法

C57BL6（B6）マウスもしくは、Vα19Jα33 トランスジェニックマウスに Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG)由来のペプチド MOG₃₅₋₅₅ をフロイト完全アジュバントとともに免疫して EAE を誘導し、臨床症状を比較し

た。臨床スコアは以下のとおりとした。0：正常、1：尾のトーンスの低下、2：尾の完全下垂、3：歩行異常、4：後肢完全脱力、5：前肢脱力を含む後肢完全脱力、6：死亡。MOG₃₅₋₅₅ に対するリンパ球の反応性は、MOG₃₅₋₅₅ 感作後 10~14 日目のマウスのリンパ節細胞を摘出し、MOG₃₅₋₅₅ による再刺激を行い、増殖反応ならびに培養上清中のサイトカイン濃度を、ELISA 法もしくは Cytometric Beads Array (CBA)を用いて測定した。MOG₃₅₋₅₅ に対する抗体のアイソタイプは、ELISA 法を用いて測定した。

C. 研究結果

EAE の臨床スコアは、野生型 B6 マウスに比較して、Vα19Jα33 トランスジェニックマウスでは、最大値（重症度）が有意に低かった。また、CD1 ノックアウトマウス（CD1 拘束性 Vα14NKT 細胞が存在しない）にかけあわせた、Vα19Jα33 トランスジェニック/CD1 ノックアウトマウスにおいても、EAE の臨床スコアの最大値は有意に低かった。いずれいれも、罹患率に差はなかった。MOG₃₅₋₅₅ 特異的リンパ球の増殖反応は、Vα19Jα33 トランスジェニックマウスでも野生型 B6 マウスでも有意な差はみられなかった。MOG₃₅₋₅₅ 特異的リンパ球のサイトカイン産生については、Vα19Jα33 トランスジェニックマウスでは IL-2 の産生低下がみられた。TNF-α、IFN-γ、IL-13 については有意差がなかった。IL4、IL-5 については検出されなかった。Vα19Jα33 トランスジェニック/CD1 ノックアウトマウスでは、CD1 ノックアウトマウスに比較して MOG₃₅₋₅₅ 特異的リンパ球の増殖反応に差はみられなかった。サイトカインでは、IL-2、TNF-α、IFN-γ、IL-13、IL-6 について

Vα19Jα33 トランスジェニック/CD1 ノックアウトマウスではコントロールに比較して有意に産生低下がみられた。IL-10 は、Vα19Jα33 トランスジェニック/CD1 ノックアウトマウスにおいて産生が増加していた。IL4、IL-5 については測定感度以下であった。MOG に対する抗体のアイソタイプは、Vα19Jα33 トランスジェニック/CD1 ノックアウトマウスで、IgG1、IgE が有意に高く、MOG に対する反応が Th 2 に偏倚していることが示された。

D. 考察

これまで、我々は、Vα14NKT 細胞を標的として、多発性硬化症のモデルである EAE を抑制する方法について検討してきた。Vα19Jα33T 細胞は、クラス Ib 分子による抗原提示、活性化マーカーの発現など、CD1 拘束性の Vα14NKT 細胞と類似しているが、生体での機能については報告がない。そこで、Vα19Jα33T 細胞の EAE における機能を調べ、治療標的としての可能性についての検討を行った。Vα19Jα33T 細胞は、マウスにおいて Vα14NKT 細胞と比較すると其の数が少ないことから、Vα19Jα33 トランスジェニックマウスを用いて、EAE の病態をコントロール群と比較した。さらに、Vα14NKT 細胞の存在しない Vα19Jα33 トランスジェニック/CD1 ノックアウトマウスについても、EAE の病態について CD1 ノックアウトマウスと比較した。Vα19Jα33 トランスジェニックマウスでも、Vα19Jα33 トランスジェニック/CD1 ノックアウトマウスにおいても、臨床症状は強く抑制された。その抑制機序を検討するために、Vα19Jα33 トランスジェニック/CD1 ノックアウトマウスにおける、MOG 特異的リンパ球の反応を

調べた結果、感作自己抗原である MOG に対する反応が Th2 偏倚しており、V α 19J α 33T 細胞は、抗原特異的 T 細胞の Th1/Th2 分化に影響を与えたと考えられた。この Th2 偏倚が、自己抗原特異的なものかどうかについては、今後さらに検討を加える必要がある。また、V α 19J α 33 トランスジェニック/CD1 ノックアウトマウスでは、MOG 存在下で感作リンパ球を培養すると、IL-10 の産生が増加していたが、IL-10 産生細胞の特定が必要である。MOG 特異的な IL-10 産生性の制御性 T 細胞 (Tr1) が誘導されたのか、または B 細胞などによって産生されている可能性がある。また、V α 19J α 33T 細胞がどのような機序で、MOG 反応性 T 細胞の Th2 偏倚を促進するのかについて解析することが必要である。現時点では、MAIT 細胞を特異的に刺激できる抗体もしくはリガンドが明らかでない。島村らの報告から α -ManCer が MAIT 細胞を刺激する可能性があることが示唆されているが、 α -ManCer の投与は EAE に対して影響をあたえなかった。そこで、 α -ManCer の変異体をスクリーニングする過程で EAE を抑制する糖脂質があることがわかった。今後 MRI ノックアウトマウスを用いて、これらの糖脂質が MAIT 細胞依存性に EAE を抑制するのかどうかについて検討を進め、その作用機序について明らかにすることが重要である。また、V α 19J α 33T 細胞を特異的に検出できる抗体などが得られていないため、生体内での解析が困難であることから、研究の促進には抗体等の作製が急務である。

E. 結論

V α 19J α 33 トランスジェニックマウス、もしくは V α 19J α 33 トランスジェニック/CD1 ノ

ックアウトマウスでは、EAE がコントロール群に比較して有意に軽症であった。V α 19J α 33 トランスジェニック/CD1 ノックアウトマウスでは、MOG 反応性 T 細胞の Th2 偏倚がみられた。以上のことから V α 19J α 33T 細胞は多発性硬化症に代表される Th1 優位な自己免疫疾患に抑制的に作用することがわかり、V α 19J α 33T 細胞は自己免疫疾患治療の標的となる可能性があることが示唆された。また、V α 19J α 33 細胞を特異的に刺激し、EAE を抑制する抗原の探索は、自己免疫疾患の新しい治療戦略につながる研究として期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I 論文発表

原著

- 1) Chiba A, Oki S, Miyamoto K, Hashimoto H, Yamamura T and Miyake S. Suppression of collagen-induced arthritis by natural killer T cell activation with OCH, a sphingosine-truncated analog of alpha-galactosylceramide. *Arthritis Rheum.* 50(1): 305-313, 2004
- 2) Oki S, Chiba A, Yamamura T and Miyake S. The clinical implication and molecular mechanism of preferential IL-4 production by modified glycolipid-stimulated NKT cells. *J. Clin. Invest.* 113(11): 1631-1640, 2004
- 3) Takahashi T, Miyake S, Endoh M and Yamamura T.

The regulatory role for natural killer cells in the “smoldering” state of multiple sclerosis. **Brain** 127, 1917-1927, 2004

4) Nakai Y, Iwabuchi K, Fujii S, Ishimori N, Dashtsoodol N, Watano K, Mishima T, Iwabuchi C, Kato K, Tanaka S, Bezbradica JS, Nakayama T, Taniguchi M, Miyake S, Yamamura T, Kitabatake A, Joyce S, Van Kaer L and Onoe K. Natural killer T cells accelerate atherogenesis in mice. **Blood** 104(7), 2051-5059, 2004

5) Satoh J-i, Nakanishi M, Koike F, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T and Yamamura T. Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. **Neurobiol. Dis.** In press

6) Ueno, Y., S. Tanaka, M. Sumii, S. Miyake S, Tazuma, M. Taniguchi, T. Yamamura and K. Chayama: Single dose of OCH improves mucosal Th1/Th2 cytokine balance and prevents experimental colitis in the presence of Va14 NKT cells in mice. **Inflamm. Bowel Disease** In press

7) Hashimoto D, Asakura S, Miyake S, Yamamura T, van Kaer L, Liu C, Tanimoto M, Teshima T. Stimulation of host natural killer T cells by synthetic glycolipid regulates acute graft-versus-host disease by inducint Th2 polarization of donor T cells. **J. Immunol.** 174(1):551-556, 2005

総説

1) 三宅幸子 : NKT 細胞と自己免疫疾患 **内科** 93(2): 213-216, 2004

2) 三宅幸子 : 免疫制御細胞と自己免疫疾患 **Mol. Med.** 41(2):177-182, 2004

3) 三宅幸子 : ナチュラルキラーT 細胞を標的とした糖脂質による多発性硬化症の分子治療 **医学のあゆみ** 208(5):449-453, 2004

4) 三宅幸子 : NKT 細胞の機能改変を目指した変異リガンド **現代医療** 36(7):113-1443, 2004

5) 三宅幸子 : Cbl ファミリーと自己免疫 **分子リウマチ** 1(3):16-22, 2004

6) 大木伸司, 三宅幸子 : ナイープ T 細胞の共刺激における LFA-1 の作用機序 **臨床免疫** 42(3): 375-8, 2004

7) 三宅幸子 : 自己免疫疾患と細胞性免疫 **MEDICO** 35(10):9-11, 2004

8) 三宅幸子 : NKT 細胞と自己免疫疾患 **医学のあゆみ** 211(6):715-720, 2004

9) 千葉麻子, 三宅幸子 : NKT 細胞を標的とした関節炎治療法の開発 **リウマチ科** In press

10) 三宅幸子 : NKT 細胞からの TH2 サイトカイン産生を誘導する合成糖脂質 **臨床免疫** 42(2): 202-5, 2004

11) 三宅幸子 : NKT 細胞を標的とした自己免疫疾患治療法 **アレルギー科** 18(6): 467-75, 2004

II 学会発表

国際学会