

- pathogenesis of collagen-induced and antibody-induced arthritis. American College of Rheumatology 68th Annual Scientific Meeting, Orlando, Florida. October 25, 2003 (Arthritis Rheum. 50:S270, 2004)
- 1) Masumura M, Miyake S, Miyamoto K, Mizuno M and Yamamura T. A new synthetic glycolipid OCH suppressed experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by inducing Th2 bias of natural killer (NK) T cells. 56th Annual Meeting of American Academy of Neurology, San Francisco, April 27, 2004
 - 2) Oki S, Chiba A, Yamamura T, Miyake S. 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, Montreal, July 19, 2004
 - 3) Miyake S, Chiba A, Yamamura T, Oki S. The molecular basis of preferential IL-4 production by OCH-stimulated NKT cells. The 3rd International Workshop on NKT cells and CD1 Antigen Presentation, Australia, Sept. 9, 2004
 - 4) Takeda K, Ikarashi Y, Miyake S, Yamamura T, Wakasugi H, Kronenberg M, Okumura K. Modulation of iNKT cell responses by their specific ligands. The 3rd International Workshop on NKT cells and CD1 Antigen Presentation, Australia, Sept. 9, 2004
 - 5) Oki S, Mizuno M, Tomi C, Yamamura T, Miyake S. Molecular basis of NKT cell aptitude as primary source of cytokine production for regulation of immune responses in vivo. The 3rd International Workshop on NKT cells and CD1 Antigen Presentation, Australia, Sept. 9, 2004
 - 6) Chiba A, Kaieda S, Oki S, Yamamura T, Miyake S. The critical role of NKT cells in the
- 1) 林幼偉、三宅幸子、山村隆：SJL/J マウスに脳炎惹起性を有するペプチド間のヒエラルキーおよび制御性機能に関する研究、第 16 回日本神経免疫学会、2004 年 1 月 30 日、東京
 - 2) 升村誠、三宅幸子、山村隆：新規糖脂質 OCH リガンドによる多発性硬化症治療の可能性：PLP 免疫 SJL/J マウス EAE モデルを用いた検討、第 16 回日本神経免疫学会、2004 年 1 月 30 日、東京
 - 3) 千葉麻子、大木伸司、橋本博史、山村隆、三宅幸子：NKT 細胞を標的とした自己免疫疾患制御法の開発、第 48 回日本リウマチ学会、2004 年 4 月 16 日、岡山
 - 4) 三宅幸子：NKT 細胞を標的とした自己免疫疾患治療法の開発、第 16 回日本アレルギー学会、2004 年 5 月 13 日、前橋
 - 5) 林幼偉、三宅幸子、山村隆：SJL マウスの PLP136-150 感作 EAE における EAE 再誘導に対する抵抗性、第 34 回日本免疫学会、2004 年 12 月 1 日、札幌
 - 6) 荒浪利昌、三宅幸子、山村隆：多発性硬化症寛解期における NK 細胞 CD11c 発現上昇、第 34 回日本免疫学会、2004 年 12 月 1 日、札幌
 - 7) 海江田信二郎、千葉麻子、Croxford Ludovic、大木伸司、島村道夫、山村隆、三宅幸子：マウス関節

国内学会

炎も出るにおける V α 14NKT 細胞ならびに V α 19NKT 細胞の機能解析、第 34 回日本免疫学会、2004 年 12 月 1 日、札幌

8) 塚本和行、大辻希樹、中村和裕、三宅幸子、山村隆、広瀬幸子：NKT 細胞の SLE 病態における役割、第 34 回日本免疫学会、2004 年 12 月 1 日、札幌

9) 大木伸司、山村隆、三宅幸子：NKT 細胞によるサイトカイン産生の分子基盤、第 34 回日本免疫学会、2004 年 12 月 1 日、札幌

10) Croxford Ludovic, 三宅幸子、島村道夫、山村隆：Over-expression of V α 19-J α 33 invariant NKT cells regulate clinical disease in a model of multiple sclerosis. 第 34 回日本免疫学会、2004 年 12 月 1 日、札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

「V α 19-J α 33 NKT 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」

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

研究要旨

昨年度に引き続き、Invariant V α 19-J α 33 TCR α 鎖発現新規 NKT 細胞 (V α 19 NKT 細胞) の免疫制御機能に基礎をおく自己免疫性神経疾患治療法開発を目的として、本年度は V α 19 NKT 細胞のリガンドについて検討を加えた。抗原候補物質として昨年度見出した α -ManCer のセラミド部位の構造変換体の免疫活性を検討し、これの共存下 V α 19 NKT 細胞が過剰発生する Invariant V α 19-J α 33 TCR α トランスジェニック(Tg)マウス肝臓リンパ球を培養したときの免疫応答を調べた結果、 α -ManCer と比較してより Th1 サイトカイン(IFN- γ)の分泌を増強する物質、Th2 サイトカイン(IL-4)分泌を増強する物質、および両者ともに増強する物質が見い出された。これらは今後疾患の種類、症状に合わせた治療に有用となる可能性をもつ。

A. 研究目的

TCR への刺激に応答して Invariant V α 19-J α 33 TCR α 鎖発現新規 V α 19 NKT 細胞は免疫系制御に重要なサイトカイン IL-4, IL-10, IL-12, IL-17, IFN- γ 等を分泌し、Th1/Th2 バランスのホメオスタシスへの寄与の可能性がある。特異抗原により V α 19 NKT 細胞の免疫応答を制御して免疫系の Th1 /Th2 ホメオスタシス維持を可能とし、これに基づいた自己免疫性神経疾患の新規な治療法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

Invariant V α 19-J α 33 TCR α 鎖 TCR α 遺伝子を TCR α プロモーター及びエンハンサーに繋いで作成したトランスジーン

が過剰発現するトランスジェニック (V α 19Tg) マウス (TCR α -/-バックグラウンド) 肝臓リンパ球をリスポンダーとし、種々の濃度の合成糖脂質を添加して培養し、上清サイトカイン濃度、³H-チミジン取り込みによる細胞増殖を測定した。対照として B6、 β 2m-/-マウスの肝臓リンパ球をリスポンダーとして使用した。合成糖脂質は三菱ウェルファーマ社三品正博士より供与を受けた。

C. 研究結果

1. α -Man 特異的な V α 19 Tg 細胞の免疫応答

今回検討を加えた α -ManCer 変換体の化学構造を Schme に示す。V α 19Tg マウス細胞は無修飾の α -ManCer

(Man3OHC16) 同様にセラミド部位に修飾を加えた糖脂質においても α -Man 基特異的に免疫応答した。一方対照の B6 細胞では V α 14 NKT 細胞によると考えられる免疫応答が α -Gal 基特異的に誘導され、これはセラミド部位の化学修飾により減弱された。 α -ManCer に対してはセラミド部位修飾の有無にかかわらず反応性に乏しかった。

2. セラミド構造修飾と活性

α -ManCer セラミド部位 2 位にヒドロキシメチル基 (2HM)、4 位にフェニル基 (4Ph) を導入した化合物の V α 19Tg 細胞に対する免疫応答誘導を比較した (図 1)。その結果 2 HM 導入 α -ManCer(Man2HMC16, Man2HMC24) は IL-4 の分泌誘導を増強し、4 Ph 導入 α -ManCer(Man4PhC16) では IL-4, IFN- γ 両者の分泌を増強し、一方 2 HM、4Ph 両方を導入した α -ManCer(Man2HM4PhC16) は IFN- γ のみの分泌を誘導することがわかった。N アシル基を C2、C8 に短くした糖脂質では活性が減弱した。

3. 用量依存性

合成糖脂質の V α 19Tg 細胞に対する免疫刺激の濃度依存性を調べた。種々の濃度の Man4PhC16 を V α 19Tg 細胞培養中に加えその応答を調べた結果、5 μ g/ml を上限として濃度依存的に免疫応答が増加することがわかった。

4. MR1 拘束性

V α 19NKT 細胞のリガンドを特定するために MHC 拘束性の決定を試みた。MHC クラス I 様分子 MR1 遺伝子導入細胞 (ホストはヒト B リンホーマ Raji 細胞) に Man4PhC16 を取り込ませたあと培地で洗浄し、これで V α 19Tg 細胞を刺激したところ、Man4PhC16 取り込みなしの MR1Raji よりも強い免疫応答が観察された。免疫応答は MR1 遺伝子非導入 Raji 細胞を刺激細胞とした時や β 2m $^{-/-}$ マウス細胞をリスポンダーに使った時ではみられなかった。

5. リスポンダー細胞

V α 19 Tg 肝臓リンパ球のなかの α -ManCer 類に応答する細胞の本体の特定を試みた。使用した Tg マウスは TCR $\alpha^{-/-}$ バックグラウンドのためにすべての T 系列の細胞は Tg を使用している。肝臓では NK1.1 $^{+}$ T、NK1.1 $^{-}$ T 細胞がほぼ 1:1 で存在するが、TCR β 鎖、コレセプター発現等の違いにより両者の抗原特異性は異なる可能性がある。このために肝臓リンパ球を NK1.1 $^{+}$ および NK1.1 $^{-}$ に分画し、それぞれの Man4PhC16 に対する免疫応答を測定した。その結果免疫応答は NK1.1 $^{+}$ 画分の細胞にのみ認められ、V α 19NKT 細胞がリスポンダーであることが確定した。

6. α -ManCer アナログの in vivo での免疫刺激

V α 19 NKT 細胞の in vivo における Invariant TCR への刺激を合成糖脂質が引き起こすことを証明するため、V α 19Tg に Man4PhC16 (20 μ g/マウス) を投与後1時間で脾臓を取り出し、その細胞培養上清中のサイトカイン濃度を調べた。その結果培養1時間後をピークとして IL-4, IFN- γ の産生がおこることを明らかにした。

D. 考察

以上の結果より V α 19 NKT 細胞は α -Man 基を有する糖脂質を提示した MR1 をリガンドとして認識して活性化する可能性が大きい。糖脂質の MR1 による提示には2本の十分な長さの炭化水素鎖が必要である。構造変換 α -ManCer ではスフィンゴシン部位への置換基導入により MR1 分子抗原提示溝との相互作用に変化が生じ、その結果 V α 19NKT 細胞 Invariant TCR による α -Man 基認識に変化が生じたことが免疫応答の改善をもたらした要因ではないかと推測される。構造活性相関の詳細を理解するためには Invariant V α 19 TCR, α -ManCer, MR1 3者の立体構造を明確にすることが必要となる。今回のスフィンゴシン部位への置換基導入は α -GalCer の V α 14 NKT 細胞への刺激能を低下させ、CD1 抗原提示溝との相互作用は減少することが推定される。

E. 結論

V α 19 NKT および V α 14 NKT 細胞両サブセットは異なる MHC 支配を受け異なる抗原特異性を持ち、ある場合には協調的にまたある局面では互いに拮抗的に機能して免疫系の調節にあたることが示唆される。今回見いだされた α -ManCer 類似体により V α 19 NKT 細胞に特異的にその免疫応答を制御とすることが可能となった。これは今後自己免疫性神経疾患の治療に有効となる可能性をもち、今後の疾患モデル動物への作用の検討が望まれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimamura, M., Kobayashi, K., Watanabe, H., Huang, Y. -Y., Okamoto, N., Kanie, O., Goji, H., and Kobayashi, M. (2004) 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

2. 学会発表

1. 海江田信二郎、千葉麻子、John-Ludovick-Croxford、大木伸司、島村道夫、山村隆、三宅幸子、マウス関節炎モデルにおける V α 14NKT 細胞ならびに V α 19 NKT 細胞の機能解析

第33回日本免疫学会総会 札幌

2. J. Ludovic Croxford, Sachiko Miyake, Michio Shimamura and Takashi

Yamamura, Over-expression of V α 19-J α 33
Invariant NKT cells Regulate Clinical
Disease in a Model of Multiple Sclerosis
第33回日本免疫学会総会 札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を
含む）

1. 特許取得

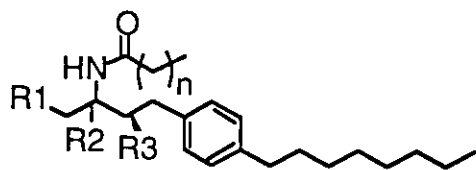
「新規 V α 19NKT 細胞の免疫賦活剤」申
請予定。

2. 実用新案登録

なし

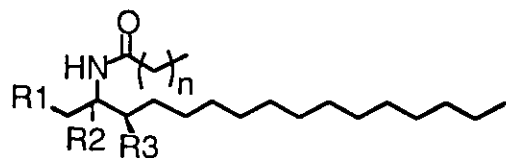
3. その他

なし



Man4PhC16 R1=Man, R2=H, R3=H, n=14

Man2HM4PhC16 R1=Man, R2=CH₂OH, R3=H, n=14



Man3OHC16 R1=Man, R2=H, R3=OH, n=14

Man2HMC16 R1=Man, R2=CH₂OH, R3=H, n=14

Man2HMC24 R1=Man, R2=CH₂OH, R3=H, n=22

ManC16 R1=Man, R2=H, R3=H, n=14

Scheme 今回検討した糖脂質の化学構造と略号

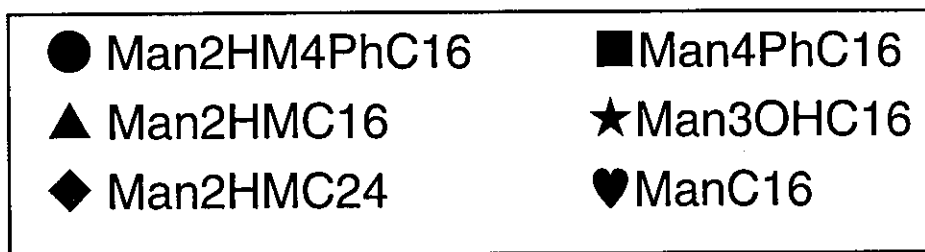
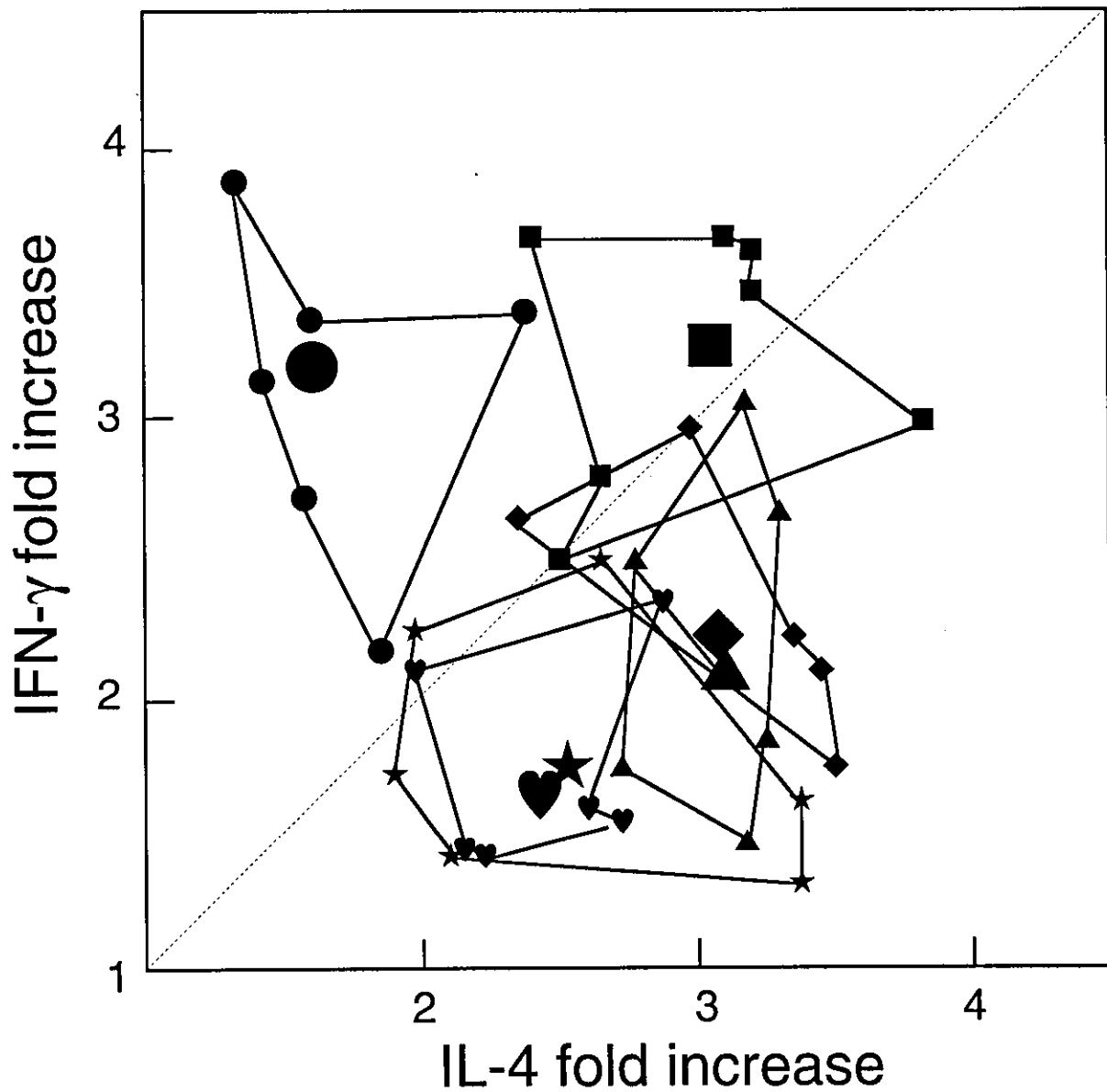


図1 合成糖脂質の免疫活性。V α 19トランスジェニックマウス肝臓リンパ球培養中に1 μ g/mlの濃度でそれぞれの糖脂質を添加し、培養2日間後の上清中のサイトカイン濃度の測定により刺激能を検定した。結果はvehicle (DMSO)を添加した培養時のサイトカイン分泌を基にした時の倍数で表わしてある。図中の大きいシンボルは平均値を表わしている。

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

分担研究者 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

MR1 分子拘束性の新しい T 細胞集団は、NK 細胞マーカーを発現することから、「第二の NKT 細胞」として、新たな研究対象として注目されている。我々は、「第二の NKT 細胞」を刺激するアルファマンノシルセラミド (α -ManCer) の改変糖脂質 (アナログ) による EAE の治療実験を行った。4 種類のアナログのうち 1 種類について、EAE の抑制活性が認められたので報告する。このアナログを、EAE 誘導操作当日に腹腔内投与されたマウスでは、EAE の著明な抑制が得られ、感作 T 細胞の Th2 偏倚が確認された。また、EAE の抑制は用量依存性であり、発症後の投与でも有効であることがわかった。以上の結果は、MR1 拘束性 T 細胞を標的とした糖脂質療法の有用性を示唆するが、今後 MR1 ノックアウトマウスなどを用いた解析を進める必要がある。

A. 研究目的

生体内における免疫制御を担うリンパ球の中で、NKT 細胞は基礎、臨床の両面から近年研究が盛んである。特に自己免疫疾患では、NKT 細胞の数や機能に変化が見られ、NKT 細胞を標的とする治療法の有用性が推測されている。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)。

NKT 細胞の抗原認識は種差を超えており、また CD1d 分子には多型性がないので、NKT 細胞の糖脂質リガンドを治療薬として考慮した場合、ペプチド療法のような個体差を考える必要がない。また、糖脂質の安全性は、臨床試験でも証明されており、実用化への障壁が低い治療法であると言える。

本プロジェクトでは、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

発を進めている。初年度に「第二の NKT 細胞」の糖脂質リガンドを合成した。本年度は、これらの糖脂質リガンドが自己免疫性炎症の治療薬として利用できるかどうか探索する目的で、EAE の治療実験を行った。

B. 研究方法

EAE の誘導には B6 マウスを用い、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。4 種類の糖脂質リガンドは、感作当日に腹腔内投与を行い、EAE の臨床経過を観察した。

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。細胞増殖は通常のチ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。Th2 偏倚の確認のために、MOG35-55 特異的抗体価を IgG1、IgG2a アイソタイプに分けて ELISA で測定した。

C. 研究結果

EAE 抑制活性を検討した 4 種類の α -ManCer 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 抑制効果は用量依存性であり、EAE 発症後に投与しても有意な抑制効果が認められた。EAE 発症の抑制されたマウスでは、

MOG35-55 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。また、血清 MOG35-55 抗体価も IgG1/IgG2a 比の上昇を示し、Th2 偏倚を支持した。

予備的な実験であるが、CD1d 欠損マウスでは、この糖脂質による EAE 抑制は不明瞭であった。EAE の抑制には、第二の NKT 細胞の活性化と、それに引き続いた古典的 NKT 細胞の活性化が必要なのかもしれない。抗原/class Ib 特異性の異なる 2 種類の NKT 細胞のクロストークという興味ある現象を反映している可能性が高い。

D. 考察

「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。また、B細胞依存性であり、B細胞の発現するMR1分子を介した相互作用が推測されている。

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。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。これまでのところ、腹腔内投与実験しか行っていないが、経口投与で有効かどうか、検討する予定である。

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。

E. 結論

MR1分子に拘束された「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が明らかになった。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り、研究を進展させる必要がある。

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. Dutronc, 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

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

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

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. Montreal, 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. Montreal, 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

Iwabuchi, K., S. Fujii, N. Ishimori, N. Dashtsoodol, T. Mishima, C. Iwabuchi, S. Tanaka, J.S. Bezbradica, T. Nakayama, M. Taniguchi, S. Miyake, T. Yamamura, A. Kitabatake, S. Jyce, L. van Kaer, K. Onoe, and Y. Nakai: A possible role of natural killer T cells in the development of atherosclerosis in mice. The Third

International Workshop on NKT cells & CD1-mediated antigen presentation. Heron Island, Australia. September 9, 2004

Yamamura, T.: A keynote lecture. The role of invariant NKT cells and NK cells in EAE and MS. MPI for Neurobiology. Neuroimmunology Workshop. Ringberg, Germany, January 19, 2005

佐藤準一、中西恵美、尾上祐行、古池史子、山村隆：MSにおけるアポトーシス関連遺伝子群の発現異常。第45回日本神経学会総会。東京、平成16年5月12日

橋本 大悟、朝倉 昇司、三宅 幸子、山村隆、Luc Van Kaer、Chen Liu、谷本 光音、豊嶋 崇徳：NKT細胞刺激による急性GVHD予防。第66回日本血液学会総会、京都、平成16年9月17日

中原とも子、阿部香織、千葉麻子、山村隆、橋本博史、三宅幸子：膠原病患者におけるCD1d拘束性NKT細胞の機能解析。第32回日本臨床免疫学会総会。東京、平成16年10月8日

荒浪利昌、高橋和也、三宅幸子、山村隆：多発性硬化症寛解期におけるNK細胞のCD11c発現亢進。第32回日本臨床免疫学会総会。東京、平成16年10月8日

佐藤準一、中西恵美、尾上祐行、古池史

子、山村 隆：末梢血 T 細胞の DNA マイクロアレイ解析による多発性硬化症の病型分類. 第 32 回日本臨床免疫学会総会. 東京、平成 16 年 10 月 8 日

Oki, S., A. Chiba, T. Yamamura and S. Miyake: Differential NKT cell responses against glycolipid ligands with a various lipid chain structure. 第 77 回日本生化学会、横浜、平成 16 年 10 月 14 日

林 幼偉、三宅 幸子、山村 隆：SJL マウスの PLP136-150 感作 EAE における EAE 再誘導に対する抵抗性：寛解期の所属リンパ節に誘導される CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞の役割. 第 34 回日本免疫学会総会、札幌、平成 16 年 12 月 1 日

佐藤 準一、中西 恵美、尾上 祐行、古池 史子、山村 隆：末梢血 T 細胞遺伝子発現プロフィールに基づく多発性硬化症病型分類. 第 34 回日本免疫学会総会、札幌、平成 16 年 12 月 1 日

荒浪 利昌、三宅 幸子、山村 隆：多発性硬化症寛解期における NK 細胞 CD11c 発現上昇. 第 34 回日本免疫学会総会、札幌、平成 16 年 12 月 1 日

海江田 信二郎、千葉 麻子、Ludovic Croxford、大木 伸司、島村 道夫、山村 隆、三宅 幸子：マウス関節炎モデルにおける V α 14 NKT 細胞ならびに V α

19 NKT 細胞の機能解析. 第 34 回日本免疫学会総会、札幌、平成 16 年 12 月 2 日

塚本 和行、大辻 希樹、中村 和裕、三宅 幸子、山村 隆、広瀬 幸子：NKT 細胞の SLE 病態における役割. 第 34 回日本免疫学会総会、札幌、平成 16 年 12 月 2 日

中原 とも子、阿部 香織、千葉 麻子、山村 隆、橋本 博史、三宅 幸子：膠原病患者における CD1 拘束性 NKT 細胞の糖脂質抗原に対する反応性の検討. 第 34 回日本免疫学会総会、札幌、平成 16 年 12 月 3 日

大木 伸司、山村 隆、三宅 幸子：NKT 細胞によるサイトカイン産生の分子基盤-T 細胞との比較. 第 34 回日本免疫学会総会、札幌、平成 16 年 12 月 3 日

Croxford Ludovic、三宅 幸子、山村 隆：Over-expression of V α 19-J α 33 invariant NKT cells regulate clinical disease in a model of multiple sclerosis. 第 34 回日本免疫学会総会、札幌、平成 16 年 12 月 3 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

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

分担研究者 神田 隆

山口大学医学部脳神経病態学神経内科

共同研究者 沼田幸代、水澤英洋

東京医科歯科大学大学院脳神経病態学

研究要旨

ヒト自己免疫性末梢神経障害において、血液神経関門(Blood-Nerve Barrier, BNB)の破綻と修復は病勢の進行・終息の鍵となる病的プロセスである。BNBの本体は隣接内皮細胞間の tight junction であり、今回我々はその構成蛋白 4 種類 (claudin-1, claudin-5, occludin, ZO-1) について生検腓腹神経を用いた免疫組織化学的検討を行い、BNBの破綻が想定される疾患である慢性炎症性脱髄性多発根神経炎(CIDP)において、claudin-5の発現低下とZO-1の局在変化を見いだした。

A.研究目的

脳および末梢神経神経内膜毛細血管を構成する内皮細胞は血液脳関門(blood-brain barrier, BBB)および血液神経関門(blood-nerve barrier, BNB)の本体であり、上皮細胞類似の tight junction を有している。末梢神経系のバリアーシステムである BNB の破綻は、抗ミエリン抗体、炎症性サイトカインなどの末梢神経実質内流入を促し、ギラン・バレー症候群や慢性炎症性脱髄性多発根神経炎(CIDP)などの自己免疫性末梢神経障害の発症・増悪に大きく関与することが想定されるが¹⁾²⁾、BNBの本体である tight junction を構成する蛋白については、正常組織における発現、病的状態での動態のいずれについてもこれまで十分な検討がなされていなかった。本研究において、我々は tight junction 関連蛋白のうち claudin-1, claudin-5, occludin, ZO-1 の 4 種類につき、生検腓腹神経を用いた免疫組織化学的検討を行った³⁾。

B.研究方法

1. 免疫組織化学

26名の末梢神経障害患者から得られた生

検腓腹神経(CIDP 10例、Churg-Strauss 症候群 6例、遺伝性ニューロパチー6例、ビタミン B1 欠乏性ニューロパチー4例)の連続凍結切片(10mm厚)を用いた。アセトン固定(4°C、5分)の後 0.03% H_2O_2 /メタノール処理し、免疫染色に供した。一次抗体としてウサギポリクロナル抗 claudin-1, claudin-5, occludin, ZO-1 抗体 (Zymed, California, USA ; 1 : 400 - 1 : 800) を用いた。

2. 定量的検討

(1) Claudin-5 陽性微小血管パーセンテージの算定：同一検体から作成されたエポン包埋トルイジンブルー染色標本を用いて神経内膜内微小血管(直径 30 μ m以下)密度を算定し、これを分母として抗 claudin-5 抗体陽性神経内膜内微小血管(直径 30 μ m以下)密度を除することで claudin-5 陽性微小血管のパーセンテージを各症例について求めた。前者が後者を下回る場合は 100%として算定した。

(2) 抗 ZO-1 染色パターンの解析：正常神経内膜内微小血管を抗 ZO-1 抗体で染色すると、隣接する内皮細胞間の点状あるいは線状の immunoreactivity が 1 血管あたり 2 個以上観察される。この局在が

不明瞭化し、内皮細胞全体に薄く染色されるものを異常パターンと解釈するが、全抗 ZO-1 抗体陽性微小血管密度を分母として正常染色パターンを示す微小血管の密度を除いたパーセンテージを各症例について算定した。

C. 研究結果

1. Claudin-1 の染色性は perineurial layer 全層に認められ、内層と外層の染色性の差は観察されなかった。CIDP とその他の非炎症性末梢神経疾患との染色性の差も認められなかった。

2. 抗 occludin 抗体は perineurial layer の他、一部の神経外膜血管の管腔側、神経周膜に隣接した神経内膜内微小血管などを染色した。抗 claudin-1 抗体と同じく、CIDP とその他の非炎症性末梢神経疾患との染色性の差は認められなかった。

3. ZO-1, claudin-5 の immunoreactivity は CIDP と非炎症性末梢神経疾患との間で顕著な差異を認めた。

4. 抗 ZO-1 抗体は、対照例では神経内膜内微小血管内皮細胞の他、一部の神経外膜血管の内皮細胞面および perineurial layer を染色した。対照例では抗 ZO-1 抗体による染色性は内皮細胞間に局限するが、この局在パターンが不明瞭になる微小血管が CIDP 症例で有意に増加した。

5. Claudin-5 の染色性は、対照例では神経内・外膜を問わずすべての内皮細胞に観察されたが、CIDP 症例では神経内膜内微小血管における immunoreactivity が有意に低下していた。

D. 考察

CIDP、ギラン・バレー症候群をはじめとする自己免疫性炎症性ニューロパチーでは、各種の炎症性サイトカインが BNB の透過性を亢進させることで疾患活動性に関与していることが想定されているが、中でも最も強いバリアー透過性亢進作用を持つのは vascular endothelial growth factor (VEGF) である。VEGF は内皮細胞膜上のチロシンキナーゼ型レセプターである flt-1, flt-k に結合することによって

occludin その他のタイトジャンクション関連蛋白の発現を低下させ、BNB 機能低下を招来させると考えられており⁴⁾、われわれは BNB の本体である神経内膜内微小血管において各種タイトジャンクション蛋白が実際に炎症性ニューロパチーで変化しているか否かを免疫組織化学的に検証する目的で本研究に着手し、ZO-1, claudin-5 の 2 種のタイトジャンクション関連蛋白が CIDP で有意に変化していることを見いだした。

Claudin-5 は隣接内皮細胞間に局在する蛋白で、血管透過性のコントロールに重要な役割を持っているものと考えられているが、バリアー機能を有する内皮細胞に特異的に発現する蛋白ではないため、今回我々の検索で見られた神経内膜微小血管での選択的な発現低下はむしろ意外な結果であった。しかし、最近新田ら⁵⁾は claudin-5 ノックアウトマウスにおいて比較的小さな物質(800Da 以下)の BBB 透過性が亢進していることを見いだしており、彼らの研究では BNB に関しては言及していないものの、CIDP 症例での claudin-5 発現低下は微小物質の BNB 透過性亢進を惹起して疾患活動性に関連していることが示唆された。

ZO-1 は claudin や occludin などの各種タイトジャンクション蛋白をつないで一つの unit とする“足場”としての機能を有する蛋白で、BNB においてもキーとなる役割を演じている可能性が考えられているが⁶⁾、これまでの研究では一定の見解は得られていなかった。ウシ培養脳毛細血管内皮細胞において VEGF が ZO-1 の総量を変えることなくその局在を細胞間から細胞周辺へと変化させることが最近報告されており、今回の我々の結果も、CIDP において VEGF をはじめとする各種炎症性サイトカインが BNB 担当内皮細胞に作用して、ZO-1 の局在変化をきたしたものと考えられる。

E. 結論

CIDP の生検腓腹神経神経内膜微小血管において、claudin-5 の発現低下と ZO-

1の局在変化を見いだした。同血管はBNBの本体であり、これらのタイトジャンクション関連蛋白の変化はCIDPにおけるBNB破綻を反映しているものと考えた。

文献

- 1) Kanda T et al.: Anti-GM1 antibody facilitates leakage in an in vitro blood-nerve barrier model. *Neurology* 55: 585-587, 2000.
- 2) Kanda T et al.: Sera from Guillain-Barre patients enhance leakage in blood-nerve barrier model. *Neurology* 60: 301-306, 2003.
- 3) Kanda T et al.: Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: decreased claudin-5 and relocated ZO-1. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75: 765-769, 2004.
- 4) Gale NW et al.: Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev* 13: 1055-1066, 1999.
- 5) Nitta T et al.: Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5 deficient mice. *J Cell Biol* 161: 653-660, 2003.
- 6) Zahraoui A et al.: Tight junction, a platform for trafficking and signaling protein complexes. *J Cell Biol* 151: F31-36, 2000.

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

I 論文発表

- 1) Takashi Kanda, Yukiyo Numata, Hidehiro Mizusawa: Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: decreased claudin-5 and relocated ZO-1. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75: 765 - 769, 2004.
- 2) Fumiaki Saito, Hiroyuki Tomimitsu, K Arai, S Nakai, Takashi Kanda, Teruo Shimizu, Hidehiro Mizusawa, Kiichiro Matsumura: A Japanese patient with distal myopathy with rimmed vacuoles: missense mutation in the

epimerase domain of the UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) gene accompanied by hyposialylation of skeletal muscle glycoproteins. *Neuromusc Disord* 14: 158-161, 2004.

- 3) Takashi Kanda, Toshio Ariga, Hisako Kubodera, Hong Lian Jin, Kiyoshi Owada, Takeshi Kasama, Masanaga Yamawaki, Hidehiro Mizusawa: Glycosphingolipid composition of primary cultured human brain microvascular endothelial cells. *J Neurosci Res* 78: 141-150, 2004.
- 4) Kazuyuki Ishida, Yoshiaki Wada, Taiji Tsunemi, Takashi Kanda, Hidehiro Mizusawa: Marked hypertrophy of the cauda equina in a patient with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy presenting lumbar stenosis. *J Neurology* 2005, in press.
- 5) Satoko Hori, Sumio Ohtsuki, Masashi Ichinowatari, Takanori Yokota, Takashi Kanda, Tetsuya 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* 2005, in press.
- 6) Jun-ichi Satoh, Nakanishi, Fumiko Koike, Sachiko Miyake, Toshiyuki Yamamoto, Mitsuru Kawai, Seiji Kikuchi, kyoichi Nomura, Kazumasa Yokoyama, Kohei Ota, Takashi Kanda, Fukazawa, Takashi Yamamura: Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 18: 2005, in press.
- 7) 神田 隆: 血液脳関門の機能. *日本医事新報* 4164: 107-108, 2004.
- 8) 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.
- 9) 神田 隆: アルコール性ニューロパチー. *Brain Medical* 16: 249-253, 2004.
- 10) 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.