

acidic GSLs similar to that reported previously for primary ECs from various sources (Kanda et al., 1994, 1997) and for immortalized human brain ECs (Duvar et al., 2000). The amount of acidic GSLs, however, is smaller than that observed in bovine BMECs (Kanda et al., 1994) and in immortalized human brain ECs (Duvar et al., 2000). The difference is more conspicuous in neutral GSLs: HBMEC comprise Gb4, Gb3, and LacCer as major constituents of neutral GSL whereas only GlcCer was detected in bovine BMECs (Kanda et al., 1994). These variations in expression might be attributable to species specificity and to SV40 T-antigen immortalization of ECs. Our data obtained from primary culture of nontransformed HBMECs thus should reflect more closely the *in vivo* GSL content of endothelial cells forming the BBB.

Species differences in neutral GSLs was also demonstrated in this study. Gb3 is known as the specific receptor for verotoxin that has been implicated strongly as the causative agent for most cases of postdiarrheal hemolytic uremic syndrome (HUS) (Lingwood, 1996) and the difference of Gb3 expression level in each organ might lead to attack of a specific organ. In this regard, preferential involvement of kidney in HUS can be well explained because verotoxin is considered to target the Gb3-rich renal microvasculature (Obrig et al., 1993) resulting in renal disorder. No reasonable explanation has ever been provided, however, for the CNS tropism in HUS. We demonstrated that the amount of Gb3 is approximately twice as abundant in HBMECs compared to that in HUVECs. This endothelial heterogeneity may explain the frequent involvement of CNS in this disorder.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. T. Tai (Department of Tumor Immunology, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science) for kindly providing anti-Gb3, anti-Gb4, and anti-paragloboside monoclonal antibodies.

REFERENCES

- Ando S, Chang NC, Yu RK. 1978. High-performance thin-layer chromatography and densitometric determination of brain ganglioside composition of several species. *Ann Biochem* 89:437-450.
- Ariga T, Kohriyama T, Freddo L, Latov N, Saito M, Kohn K, Ando S, Suzuki M, Hemling ME, Rinehart KL, Kusunoki S, Yu RK. 1987. Characterization of sulfate glucuronic acid containing glycolipids reacting with IgM-M proteins in patients with neuropathy. *J Biol Chem* 262:848-853.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Chou DK, Ilyas AA, Evans JE, Costello C, Quades RH, Jungalwala FB. 1986. Structure of sulfated glycolipids in the nervous system reacting with HNK-1 antibody and some IgM paraprotein in neuropathy. *J Biol Chem* 261:11717-11725.
- Chou DK, Jungalwala FB. 1988. Sulfoglucuronyl neolactoglycolipids in adult cerebellum: specific absence in murine mutants with Purkinje cell abnormality. *J Neurochem* 50:1655-1658.
- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR. 1989. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:695-698.
- Duvar S, Suzuki M, Muruganandam A, Yu RK. 2000. Glycosphingolipid composition of a new immortalized human cerebrovascular endothelial cell line. *J Neurochem* 75:1970-1976.
- Fukuda MN, Dell A, Oates JE, Wu P, Klock JC, Fukuda M. 1985. Structures of glycosphingolipids isolated from human granulocytes. *J Biol Chem* 260:1067-1082.
- Gordon EL, Danielsson PE, Nguyen T, Winn HR. 1991. A comparison of primary cultures of rat cerebral microvascular endothelial cells to rat aortic endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 27:313-326.
- Handa S. 1963. Blood group active glycolipid from human erythrocytes. *Jpn J Exp Med* 33:347-360.
- Ishikawa D, Kato T, Handa S, Taki T. 1995. New methods using polyvinylidene difluoride membranes to detect enzymes involved in glycosphingolipid metabolism. *Anal Biochem* 231:13-19.
- Jaffe EA. 1987. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol* 18:234-239.
- Kanda T, Iwasaki T, Yamakawa T, Ikeda K. 1997. Isolation and culture of bovine endothelial cells of endoneurial origin. *J Neurosci Res* 49:769-777.
- Kanda T, Usui S, Beppu H, Miyamoto K, Yamawaki M, Oda M. 1998. Blood-nerve barrier in IgM paraproteinemic neuropathy: a clinicopathologic assessment. *Acta Neuropathol (Berl)* 95:184-192.
- Kanda T, Yamawaki M, Ariga T, Yu RK. 1995. Interleukin-1 beta up-regulates the expression of sulfoglucuronosyl paragloboside, a ligand for L-selectin, in brain microvascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7897-7901.
- Kanda T, Yoshino H, Ariga T, Yamawaki M, Yu RK. 1994. Glycosphingolipid antigens in cultured microvascular bovine brain endothelial cells: sulfoglucuronosyl paragloboside as a target of monoclonal IgM in demyelinating neuropathy. *J Cell Biol* 126:235-246.
- Karlsson KA. 1995. Microbial recognition of target-cell glycoconjugates. *Curr Opin Struct Biol* 5:622-635.
- Kawasaki T, Oka S. 2001. [Roles of the HNK-1 carbohydrate epitope in the nervous system.] *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 21:95-99.
- Kohriyama T, Kusunoki S, Ariga T, Yoshino JE, DeVries GH, Latov N, Yu RK. 1987. Subcellular localization of sulfated glucuronic acid-containing glycolipids reacting anti myelin-associated glycoprotein antibody. *J Neurochem* 48:1516-1522.
- Lingwood CA. 1996. Role of verotoxin receptors in pathogenesis. *Trends Microbiol* 4:147-153.
- Muthing J, Duvar S, Heitmann D, Hanisch HG, Neumann U, Lochnit G, Geyer R, Peter-Katalinic J. 1999. Isolation and structural characterization of glycosphingolipids of *in vitro* propagated human umbilical vein endothelial cells. *Glycobiology* 9:459-468.
- Nojiri H, Kitagawa S, Nakamura M, Kirito K, Enomoto Y, Saito M. 1988. Neolacto-series gangliosides induce granulocytic differentiation of human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *J Biol Chem* 263:7443-7446.
- Obrig TG, Louise CB, Lingwood CA, Boyd B, Barley-Maloney L, Daniel TO. 1993. Endothelial heterogeneity in Shiga toxin receptors and responses. *J Biol Chem* 268:15484-15488.
- Riboni L, Viani P, Bassi R, Prinetti A, Tettamanti G. 1997. The role of sphingolipids in the process of signal transduction. *Prog Lipid Res* 36:153-195.
- Saito M, Kasai N, Yu RK. 1985. *In situ* immunological determination of basic carbohydrate structure of gangliosides on thin-layer plates. *Anal Biochem* 148:54-58.
- Schwartz GA, Jungalwala FB, Chou DKH, Boyer AM, Yamamoto M. 1987. Glucuronic acid and sulfate containing glycoconjugates are temporally and spatially regulated antigens in the developing mammalian central nervous system. *Dev Biol* 120:65-76.

- Seiki T, Oka S, Terayama K, Imiya K, Kawasaki T. 1999. Molecular cloning and expression of a second glucuronyltransferase involved in the biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope. *Biochem Biophys Res Commun* 255:182-187.
- Sekine M, Ariga T, Miyatake T, Kuroda Y, Suzuki A, Yamakawa T. 1984. Ganglioside composition of chromaffin granule membrane in bovine adrenal medulla. *J Biochem (Tokyo)* 95:155-160.
- Suzuki M, Suetake K, Kasama T, Ariga T, Shiina M, Kusunoki S, Yu R.K. 2001. Characterization of a phospholipid antigen reacting with serum antibody in patients with peripheral neuropathies and paraproteinemia. *J Neurochem* 79:970-975.
- Svennerholm L. 1964. The gangliosides. *J Lipid Res* 5:145-153.
- Taki T, Ishikawa D, Handa S, Kasama T. 1995. Direct mass spectrometric analysis of glycosphingolipid transferred to a polyvinylidene difluoride membrane by thin-layer chromatography blotting. *Anal Biochem* 225: 24-27.
- Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, Zetter BR. 1984. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol* 99:2034-2040.
- Yoshino H, Maeda Y, King M, Cartwright MJ, Richards DW, Ariga T, Yu R.K. 1993. Sulfated glucuronyl glycolipids and gangliosides in the optic nerve of humans. *Neurology* 43:408-411.
- Yu R.K, Yoshino H, Yamawaki M, Yoshino JE, Ariga T. 1994. Subcellular distribution of sulfated glucuronyl glycolipids in human peripheral motor and sensory nerves. *J Biomed Sci* 1:167-171.

特集I

Th1/Th2バランスをめぐって

NKT細胞のリガンドと
Th1/Th2バランス*

山村 隆**

Key Words : NKT cell, Th1/Th2, EAE, autoimmunity

はじめに

NK細胞のマーカーを発現するT細胞の中には、ペプチド/MHCではなく、糖脂質/CD1d分子を認識する集団が存在する。このような性質をもつのがNKT細胞と呼ばれる細胞集団で、数こそ少ないが、細胞障害活性や顕著なサイトカイン産生能などを発揮して、癌、感染、自己免疫などに関連した免疫応答で重要な役割を果たす^{1)~3)}。NKT細胞を特異的に刺激する糖脂質リガンド α -ガラクトシルセラミド(α -galactosylceramide; α -GalCer)が発見されてからは、このリガンドや関連リガンドを投与することによって、癌、感染症、自己免疫疾患などの動物モデルが改善したという報告が相次いでおり、NKT細胞の研究は基礎と臨床にまたがる重要なテーマになっている。本稿では、NKT細胞のIL-4産生を介してTh2偏倚を効率よく誘導する糖脂質リガンドOCHの発見⁴⁾と、OCHによるTh1/Th2バランスの修飾、糖脂質リガンドの医薬としての将来性などについて解説する。

NKT細胞の特徴

NKT細胞の定義は研究者によって若干異なるが、ここで取り上げるのはCD1d分子に結合した α -GalCerを認識し、かつインバリアントTCR α

鎖(マウスではV α 14-J α 18, ヒトではV α 24-J α 18)を発現する細胞である¹⁾³⁾。 α -GalCerは海綿の成分の中から最初に発見されたNKT細胞TCRのリガンドで、NKT細胞研究のツールとして広く利用されている(図1左)。TCRを架橋する抗CD3抗体や α -GalCerで刺激すると、NKT細胞は迅速に反応し、Th2サイトカイン(IL-4, IL-10, IL-13など)とTh1サイトカイン(IFN- γ)を大量に産生する。IL-4の産生はとくに迅速で、刺激が入ってから2時間で産生のピークを迎える。このような顕著なサイトカイン産生能により、NKT細胞が免疫調節に重要な役割を果たしていることは容易に推測される。Th2細胞の分化誘導に必要なIL-4はNKT細胞が産生するのではないかと議論されたことがあるが、NKT細胞のないマウスでもTh2分化が誘導できることから、この仮説は否定された。しかし、NKT細胞が免疫調節能を発揮することは多くの実験系で証明されている。重要な点は、NKT細胞には状況に応じてTh1サイトカインとTh2サイトカインの一方、または両方を産生する能力があることである(後述)。

自然界に存在するNKT細胞の
糖脂質リガンド

健康個体の体内でNKT細胞が何を認識して免疫調節機能を発揮するのか、まだ明らかになっていない。NKT細胞の自然リガンド(natural ligand)は α -GalCerに構造的に類似した脂質であ

* Glycolipid ligands for NKT cells and Th1/Th2 balance.

** Takashi YAMAMURA, M.D.: 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部(☎187-8502 小平市小川東町4-1-1); Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, Kodaira 187-8502, JAPAN

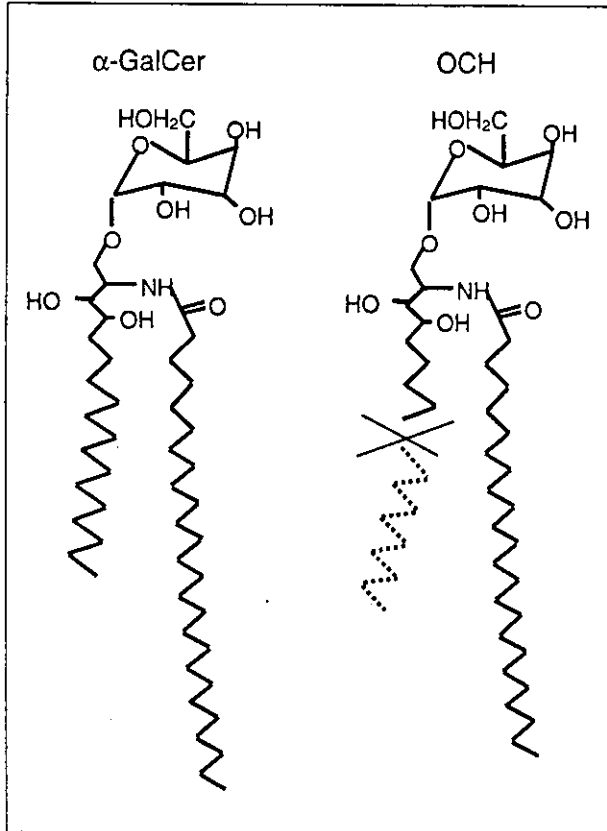


図1 α-GalCerとOCHの構造

OCHはα-GalCerの2本の疎水性炭素鎖の1本(スフィンゴシン鎖)を、炭素9個だけ短くし、もう1本のアシル鎖を炭素2個分だけ短くしたリガンドである。

ることが推測されるが、α-GalCer自体は哺乳類の生体内には存在しない。最近になって、腫瘍細胞株に由来するガングリオシドGD3や、ある種のリン脂質がNKT細胞のリガンドとして働くことが報告された⁵⁾⁶⁾。しかし、これらのリガンドが自然リガンドとして免疫制御に関与しているという証拠はない。なお、glycosyl phosphatidylinositols (GPI)が自然リガンドであるという報告もあるが、定説にはなっていない。

NKT細胞リガンドによる自己免疫病モデルの抑制

NKT細胞はTh2サイトカインを産生するので、糖脂質で刺激すればNKT細胞の調節機能が高まり、Th1細胞を介する自己免疫疾患が治療できるかもしれない。このような発想に基づき、われわれは代表的な自己免疫動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis ; EAE)を利用して、α-GalCer

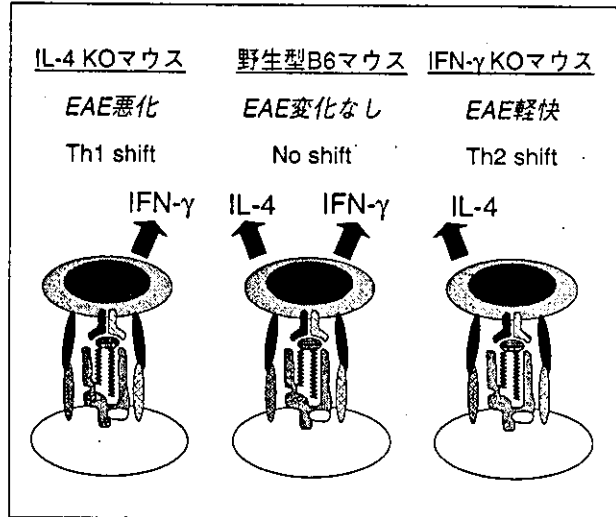


図2 α-GalCerによるEAE修飾実験の結果
α-GalCerは野生型マウスのEAEには影響を与えないが、IL-4 KOマウスのEAEは悪化させ、IFN-γ KOマウスのEAEは軽快させた。この結果は、NKT細胞の産生するIL-4とIFN-γのバランスがEAEの病態に大きな影響を与えることを意味する。

による治療実験を行った⁷⁾。EAEは中枢神経抗原ペプチド感作によって実験動物に誘導できる自己免疫病で、EAEを発症したマウスは中枢神経系の炎症病変とそれに伴う神経症状(後肢麻痺、失禁など)を呈する。EAEはペプチド特異的なTh1細胞移入によっても誘導が可能で、Th1細胞の関与することが確立したよいモデルである⁸⁾。われわれはB6マウスにEAEを誘導し、α-GalCerを腹腔内投与して治療効果を検討したが、期待に反してEAEは軽快も増悪もなかった。さらに実験を進めた結果、α-GalCerはIL-4ノックアウトマウス(IL-4 KO)に誘導したEAEは悪化させるが、IFN-γ KOに誘導したEAEは抑制することがわかった(図2)。一連の解析結果から、α-GalCerに反応してNKT細胞の産生するIL-4はEAE抑制的に働くが、同時に産生されるIFN-γは疾患促進的であり、結果的に野生型マウスではα-GalCerの投与効果が現れないものと解釈された。

変換糖脂質リガンドOCH

MHC拘束性T細胞では、一部のアミノ酸を他のアミノ酸で置換したペプチドで刺激すると、まったく異なるサイトカイン産生パターンを示すことがある。このようにT細胞に異なる性格を寄与するペプチドを変換ペプチドリガンド

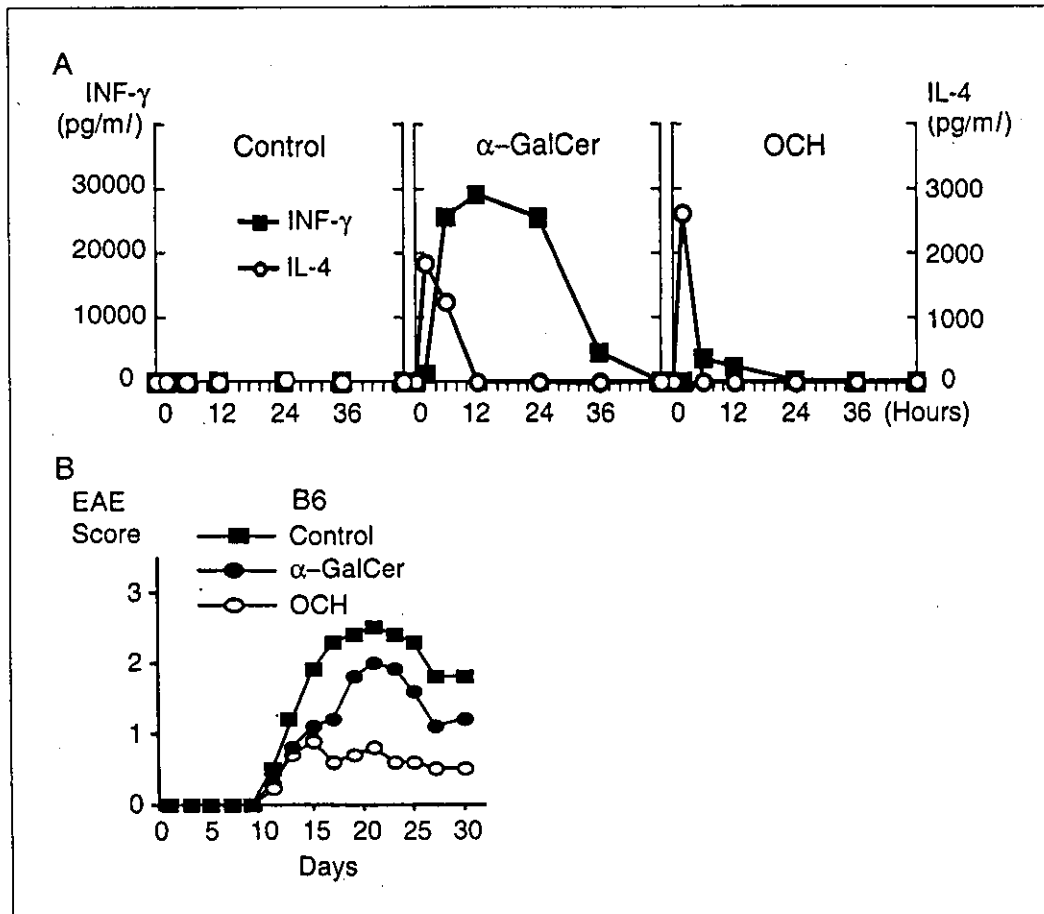


図3 α-GalCerとOCHの免疫調節活性の比較

A: 腹腔内投与後の血清サイトカイン上昇パターンの違い

α-GalCerを投与したマウスではIL-4の迅速な上昇がみられ、それに引き続いてIFN-γが上昇する。一方、OCHを投与したマウスでは、IL-4の上昇はみられるが、IFN-γはほとんど検出できない。

B: EAEの治療実験

OCH経口投与によるEAE抑制を示す。縦軸はEAEの臨床スコア、横軸はEAE誘導操作後の時間経過を示す。

(altered peptide ligand; APL)と呼ぶ。このコンセプトにヒントを得て、α-GalCerの構造を一部変えたアナログの中には、NKT細胞に選択的IL-4産生を誘導するものがあるのではないかと考え、α-GalCerに修飾を加えたアナログを複数合成した。その中で、α-GalCerの疎水性炭素鎖を短縮した化合物OCH(図1)は*in vitro*でNKT細胞の選択的IL-4産生を誘導した。また、OCHを腹腔内投与されたマウスでは、血清中のIL-4がすみやかに上昇したが、IFN-γは上昇しなかった(図3A)。野生型マウスに誘導したEAEの発症は、OCH投与によって有意に抑制され(図3B)、OCHによるNKT細胞のIL-4産生を介する可能性が考えられた。この推測は、OCHによるEAE抑制がNKT KOマウスやIL-4 KOマウスではみられないこと、OCH

で治療を受けたマウスではEAEの誘導に使用したペプチド(MOG35-55)特異的T細胞がTh2偏倚していることなどの実験結果によって支持された。なお、コラーゲン誘導関節炎の発症もEAEと同じようにOCHにより抑制されるが、α-GalCerでは抑制されない⁹⁾。これらの事実から、OCHはα-GalCerよりもTh2偏倚を誘導する能力に優れ、Th1/Th2バランスの人為的な調整を可能にする興味ある変換糖脂質リガンド(altered glycolipid ligand; AGL)であると結論づけられる。AGLがNKT細胞のサイトカイン産生プロファイルを偏倚させるメカニズムとしては、親水性部分のTCRに対するaffinityの変化、疎水性部分のCD1dに対する結合安定度の変化などを考慮する必要がある。今後の検討課題である。

おわりに

NKT細胞には作用の相反するTh1およびTh2サイトカインの両方を産生する能力があるが、そのサイトカイン産生パターンは、TCRを介する刺激の性質によって変化する。また本稿では取り上げなかったが、CD28-B7.2副刺激をブロックすることによってIL-4産生優位になることからわかるように⁷⁾、TCR以外を介するシグナルもサイトカイン産生に影響を与える。OCHのようにTh2サイトカインの優先的な産生を誘導するリガンドは、Th1/Th2バランスをTh2に偏倚させることによってTh1自己免疫病を抑制できるので、治療薬としての発展が期待できる。

自己免疫病をTh2偏倚によって治療しようというアイデアは、多くの研究者があたためてきた。とくにAPLのコンセプトが確立してから、自己反応性T細胞をTh2に偏倚させるAPLを使った多発性硬化症治療の可能性が真剣に検討され、臨床試験まで行われた。しかし、副作用や遺伝的背景に応じて多種類のペプチドを用意しなければならないために頓挫したのが実情である。一方、糖脂質を結合するCD1d分子にはMHC分子のような多型性がなく、NKT細胞の抗原受容体も比較的均一なので、1種類のリガンドで多くの患者に均一な効果が期待できる。したがってOCHのようなAGLは、免疫バランスを人為的に修飾する薬剤として、さまざまな分野での応用が期待できる。今後ヒトのNKT細胞における解析や臨床試験を経て、AGLの実用性が検証される中で、NKT細胞と免疫調節に関する理解がさらに進むことであろう。

文 献

- 1) Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2002 ; 2 : 557.
- 2) Taniguchi M, Harada M, Kojo S, et al. The regulatory role of V α 14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Annu Rev Immunol* 2003 ; 21 : 483.
- 3) Wilson SB, Delovitch TL. Janus-like role of regulatory iNKT cells in autoimmune disease and tumour immunity. *Nat Rev Immunol* 2003 ; 3 : 211.
- 4) Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* 2001 ; 413 : 531.
- 5) Wu DY, Segal NH, Sidobre S, et al. Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells. *J Exp Med* 2003 ; 198 : 173.
- 6) Rauch J, Gumperz J, Robinson C, et al. Structural features of the acyl chain determines self-phospholipid antigen recognition by a CD1d-restricted invariant NKT (iNKT) cells. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 47508.
- 7) Pál E, Tabira T, Kawano T, et al. Costimulation-dependent modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by ligand stimulation of V α 14 NK T cells. *J Immunol* 2001 ; 166 : 662.
- 8) 山村 隆. 実験的自己免疫性脳脊髄炎. *最新医学* 1997 ; 52 : 1917.
- 9) Chiba A, Oki S, Miyamoto K, et al. Natural killer T-cell activation by OCH, a sphingosine truncated analogue of α -galactosylceramide, prevents collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. In press 2004.

* * *

多発性硬化症の新しい治療薬の開発

宮本 勝一 山村 隆

■ はじめに

近年、多発性硬化症 multiple sclerosis (MS) をはじめとする自己免疫疾患とナチュラルキラーT (NKT) 細胞との関係が注目されている。疾患モデル動物では、NKT 細胞が自己免疫病の発症を抑制する調節機能をもつことが示され^{1,2)}、NKT 細胞の機能異常が MS、I 型糖尿病など、実際の自己免疫疾患の病態に関与することも推測されている^{3,4)}。NKT 細胞が α -ガラクトシルセラミド (α -GC) に代表される糖脂質をリガンドとして認識することが発見されて以来、種々の疾患に対して合成糖脂質を用いた治療の試みがなされている。我々は MS のモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) を用いて、NKT 細胞が EAE において調節的に働くことを明らかにしてきた^{5,6)}。本稿では、我々が開発した NKT 細胞を刺激する新しい合成糖脂質 (OCH と命名) の投与によって EAE が抑制できることを示し、MS の新しい治療薬としての可能性を論じる。

■ ナチュラルキラーT (NKT) 細胞の性質

NKT 細胞は、文字通り NK 細胞と T 細胞の両者の性質を併せ持つ細胞であり、多型性のない CD1d 分子により提示された糖脂質をリガンドとして認識するリンパ球である⁷⁾。また T 細胞受容体 (TCR) α 鎖が固定しているのも特徴である (マウスでは V α 14-J α 281 invariant 鎖、ヒトでは V α 24-J α Q invariant 鎖)。マウスおよびヒト NKT 細胞のリガンドとして最初に発見されたのは、海綿由来の糖脂質 α -GC であるが、 α -GC には転移性腫瘍を抑制する活性のあることが示されている⁷⁾。NKT 細胞は TCR を介した刺激によって、タイプ1ヘルパーT細胞 (Th1) サイトカ

インである IFN- γ 、およびタイプ2ヘルパーT細胞 (Th2) サイトカインである IL-4 を迅速に、かつ大量に産生する能力を持つことから、その免疫調節機能が注目されている。

■ NKT 細胞と多発性硬化症

今日では、MS は自己免疫疾患であり、その病態には中枢神経抗原を認識する Th1 細胞が中心的な役割を果たしていると考えられている。つまり IFN- γ や IL-2 などの Th1 サイトカインは MS の病態を増悪させる方向に働き、IL-4、IL-10 などの Th2 サイトカインは軽減させる方向に働くことになる。したがって α -GC による NKT 細胞活性化は、Th1 自己免疫病である MS に対しては IFN- γ を介して病態を増悪させる可能性と、IL-4 を介して抑制的に働く両方の可能性が考えられる。一般的に、MS 患者の NKT 細胞数は健康者に比べて減少している³⁾。よって NKT 細胞が病態に関与していることが推測されるが、その中でも CD4 を発現する NKT (CD4⁺NKT) 細胞が重要であることが最近明らかになってきた。CD4⁺NKT 細胞は、他の NKT 細胞に比べて IL-4 を主とする Th2 サイトカインの産生に重要であり、MS の病態に大きな影響を及ぼしているようである。寛解期に CD4⁺NKT 細胞数の減少は軽度で Th2 に偏倚していることから、CD4⁺NKT 細胞が MS の寛解維持に重要であると考えられる⁸⁾。

■ リガンド活性化 NKT 細胞と 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE)

■ α -GC 投与による解析

EAE は MS の動物モデルであり、主に Th1 に属する T 細胞が臓器傷害的に働くと考えられている。EAE はオリゴデンドロサイト糖蛋白 (MOG) などの標的自己抗原をアジュバントとともに接種することによって誘導される。

みやもと かついち 国立精神・神経センター神経研究所/免疫研究部
やまむら たかし 同 部長

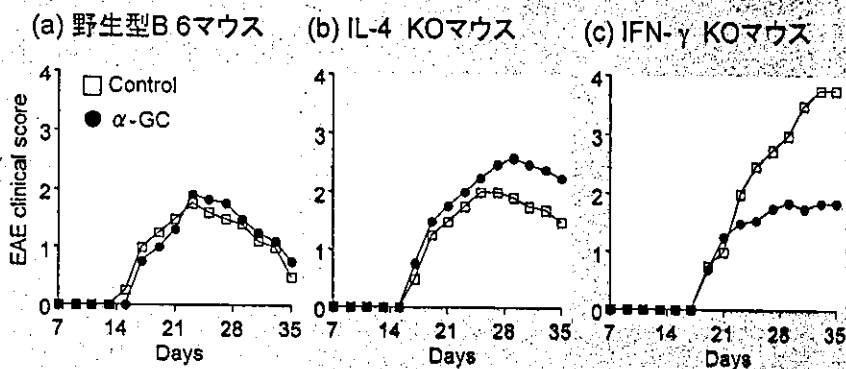


図1 a) 野生型 B6 マウス, b) IL-4 KO, c) IFN- γ KO の各々のマウスに MOG ペプチドで EAE を感作し, α -GC (100 μ g/kg) を感作当日に腹腔内投与した。野生型マウスでは α -GC は対照群と差は認めなかった(a)。しかし IL-4 KO では α -GC 投与により EAE の増悪が見られ(b), IFN- γ KO では逆に EAE が抑制された(c)。

我々は NKT 細胞のリガンドとして α -GC が発見されてから, その MS 治療薬としての可能性に興味を持ち, まず α -GC を用いて EAE に及ぼす影響を検討した。

α -GC の単回投与により野生型 B6 マウスでは, 早期に血清中 IL-4 および IFN- γ 濃度の著しい上昇がみられた。NKT ノックアウトマウス(NKT KO)では, これらの上昇は観察されないことから, 急速なサイトカイン上昇は NKT 細胞の α -GC による活性化を反映していることが示唆された。そこで, B6 マウスに MOG₃₃₋₅₅ ペプチドにて EAE を誘導し, α -GC 100 μ g/kg を MOG 感作直後に腹腔内投与した。しかし, EAE の臨床症状については対照群と治療群で有意差を認めなかった(図 1 a)。つまり, α -GC で NKT 細胞を活性化しても, EAE 修飾効果は確認されなかったわけである。この結果に対する一つの解釈として, α -GC 刺激により NKT 細胞が Th1 サイトカイン (IFN- γ) と Th2 サイトカイン (IL-4) の双方を機能的に等価になるように産生するため両者の効果が相殺し, EAE の病態に正, 負いずれの効果も及ぼさないのではないかと考えた⁹⁾。

■ サイトカインノックアウトマウスによる解析

前述の仮説を検証するために, IFN- γ を産生出来ない IFN- γ ノックアウトマウス (IFN- γ KO) と IL-4 産生が出来ない IL-4 ノックアウトマウス (IL-4 KO) を用いて解析した。

これらのマウスに同様に EAE を誘導し, α -GC を投与

したところ, IL-4 KO では EAE の増悪が見られ, IFN- γ KO では逆に EAE が軽減した(図 1 b, 1 c)⁹⁾。IL-4 KO の NKT 細胞は IFN- γ 産生能を保ち, IFN- γ KO では IL-4 産生能が保たれているので, NKT 細胞活性化に伴う IFN- γ または IL-4 産生が EAE を修飾していることが推測された。

すなわち, 野生型マウスの NKT 細胞は, α -GC 刺激により互いに拮抗する IFN- γ と IL-4 の両方を産生するため治療効果が得られないが, KO では拮抗するサイトカインが産生されないために, 増悪または抑制効果が得られるものと考えた。

糖脂質リガンドによる新たな治療の試み

■ α -GC による治療の試み

I 型糖尿病のモデルである NOD マウスでは, α -GC 投与によって症状が有意に軽減することが明らかになっている^{10,11)}。しかし EAE においては, 前述したように通常の α -GC 投与では病状を抑制することはできない。そこで α -GC の投与方法を工夫した。我々は, TCR の副刺激経路の一つである B7.2 (CD 86) を選択的に阻害する抗体の存在下で α -GC を与えると, NKT 細胞の IL-4 産生は誘導されるが IFN- γ 産生が誘導されず, 免疫バランスは Th2 にシフトすることを発見していた。そこで, この抗体と α -GC を組み合わせてパルスした抗原提示細胞を投与したところ, EAE は抑制され治療効果を認めた^{9,12)}。しかし, この方法を臨床に応用するには困難な点が多く, 現実的な治療法ではないと考えた。

別のグループは, EAE の感作時にアジュバントに α -GC を混ぜ, 数回にわたって注射したところ, 対象群に対して EAE 症状が有意に軽減したと報告している^{13,14)}。しかし, この方法も臨床応用は困難である。

■ 新しい合成糖脂質の開発

以上の結果を踏まえると, NKT 細胞に対して選択的に IL-4 を産生させるような糖脂質リガンドがあれば, EAE を抑制することが可能であると考えられる。我々は臨床応

用を考えた場合、 α -GCとは全く異なる新規の糖脂質リガンドを見出すことがより現実的であると判断し、その開発に着手した。まず α -GCの構造をベースに数多くのアナログ糖脂質を合成した。そして各々の機能を解析した結果、 α -GCのスフィンゴシン鎖を短くしたOCH(図2a)が我々の求めるような性質を持つことが明らかになった¹⁵⁾。

B6マウスに α -GCを投与した場合は血清中のIL-4だけでなくIFN- γ も上昇するが、OCHを投与するとIL-4がより選択的に上昇する(図2b)。血清サイトカインの上昇はNKT KOではみられないことから、OCHの作用はNKT細胞を介するものであることがわかった。つぎに、EAEへの治療効果を調べた。その結果、感作時にOCHを1回経口投与するだけでEAEは強く抑制され(図3a)、EAE症状の発症直後から投与を開始しても、有効であることがわかった。また、OCH投与群では抗MOG₃₅₋₅₅ IgG1が選択的に上昇していた。IgG1抗体の上昇はTh2細胞活性優位を反映することから、OCH投与によって自己免疫応答がTh2にシフトしていることがわかった。さらに、IL-4 KOを使った実験ではOCHによるEAEの効果は見られないことから(図3c)、OCHのEAE抑制にはIL-4が重要な役割を果たしていることが明らかになった。OCHが選択的なIL-4産生を誘導する機序については现阶段では明らかではないが、抗原提示細胞にコンタクトするスフィンゴシン鎖が短くなっているため結合が不安定となり、シグナルの伝達に何らかの影響を及ぼしている可能性を考えている。

今後の展望、臨床応用に向けて

このようにOCHは α -GCと質的に異なる活性を示す新しい合成糖脂質である。マウスとヒトのNKT細胞は同

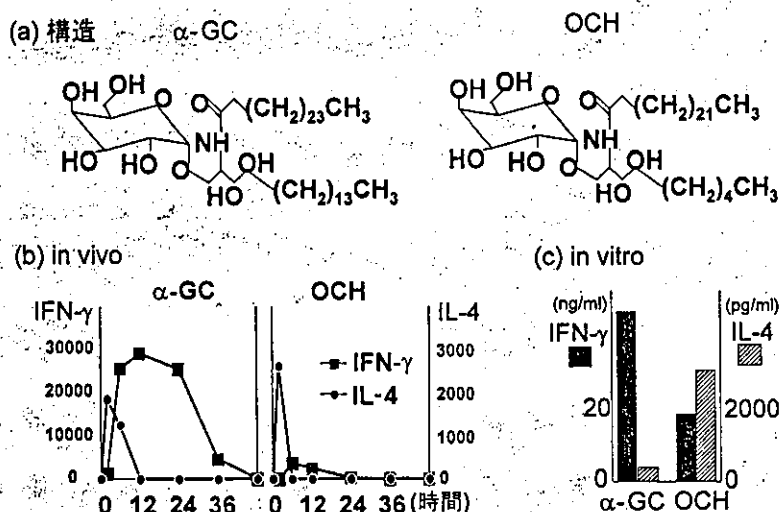


図2 新規合成糖脂質 OCH

- a) 構造. OCHは α -GCのスフィンゴシン鎖を短縮した合成糖脂質である。
 b) in vivoでの評価. B6マウスに α -GCまたはOCHを100 μ g/kg投与した後、血液を経時的に採取し、血清中サイトカインをELISA法にて定量化した。 α -GCはIFN- γ とIL-4をともに上昇させるが、OCHはIL-4上昇を選択的に誘導する。
 c) in vitroでの評価. 脾細胞を糖脂質リガンドと共培養したところ、 α -GCはIFN- γ 優位にサイトカイン産生を促したのに対し、OCHのサイトカイン産生パターンはIFN- γ よりもIL-4が優位であった。

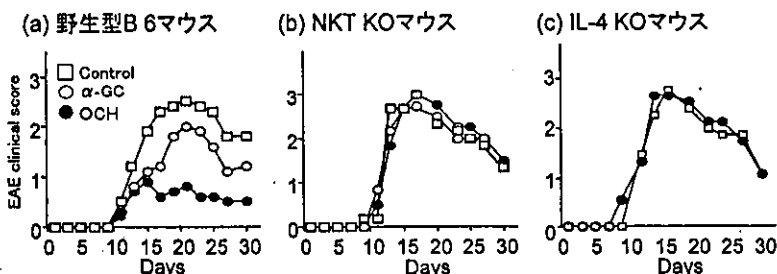


図3 OCH投与によるEAE抑制効果

B6マウスにMOG₃₅₋₅₅ペプチド(100 μ g)を用いてEAEを誘導し、EAE感作当日に α -GCおよびOCH(400 μ g/kg)を経口投与した。臨床症状は次のスケールに基づいた(0:正常, 1:尾のトーン低下, 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)。OCHはEAE症状を有意に抑制した(a)。しかしNKT KOマウスでは効果が解除された(b)。またIL-4 KOマウスを用いた場合にもOCHの効果は解除された(c)。この結果からOCHはNKT細胞を介して作用しており、EAEの抑制にはIL-4が必須であることが明らかになった。

じ糖脂質リガンドに反応するため、OCHはヒトのNKT細胞にも同様に反応する可能性が高い。実際in vitro実験において、OCHはヒトのNKT細胞に対してもマウスと同様のTh2シフトを誘導する結果が得られている(投稿準備中)。糖脂質はペプチド治療の際に問題となる抗原提示

分子の多型性を考慮する必要がない。よって1種類の糖脂質がすべての患者に同様の治療効果を発揮するものと考えられる。さらにOCHは経口投与が有効である点も評価される。副作用面でも、マウスを用いた検証では目立ったものは認められず、OCHと構造が類似した α -GCが臨床試験で大きな問題を生じていないことなどからも、臨床応用

が十分可能と考えられる。以上より、OCHはMSの新たな治療薬として大変有望である。またOCHは慢性関節リウマチのモデル動物でも明らかな治療効果があり¹⁶⁾、MSのみならずTh1自己免疫病全般の新しい治療薬となることが期待される。

文 献

- 1) Porcelli SA, Modlin RL. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 297-329.
- 2) Lehuen A, Lantz O, Beaudoin L, et al. Overexpression on natural killer T cells protects $V\alpha$ 14-J α 281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J Exp Med* 1998; 188: 1831-9.
- 3) Illes Zs, Kondo T, Newcombe J, et al. Differential expression of natural killer T cell $V\alpha$ 24 J α Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Immunol* 2000; 164: 4375-81.
- 4) Wilson SB, Kent SC, Patton KT, et al. Extreme Th1 bias of invariant $V\alpha$ 24 J α Q T-cells in type 1 diabetes. *Nature* 1998; 391: 177-81.
- 5) Zhang B, Yamamura T, Kondo T, et al. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer(NK)cells. *J Exp Med* 1997; 186: 1677-87.
- 6) 山村 隆, 張 本寧. NK, NKT細胞による自己免疫性脳炎の制御. *Annual Review 免疫* 1999. 中外医学社: 1998. p.300-6.
- 7) Kawano T, Cui J, Koezuka Y, et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of $V\alpha$ 14 NKT cells by glycosyl ceramides. *Science* 1997; 278: 1626-9.
- 8) Araki M, Kondo T, Gumperz JE, et al. Th2 bias of CD4⁺NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int Immunol* 2003; 15: 279-88.
- 9) Pal E, Tabira T, Kawano T, et al. Costimulation-dependent modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by ligand stimulation of $V\alpha$ 14 NK T cells. *J Immunol* 2001; 166: 662-8.
- 10) Hong S, Wilson MT, Serizawa I, et al. Natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med* 2001; 7: 1052-6.
- 11) Sharif S, Arreaza GA, Zucker P, et al. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat Med* 2001; 7: 1057-62.
- 12) 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. *医学のあゆみ 別冊 21世紀の神経免疫学*. 2001. p.63-6.
- 13) Singh AK, Wilson MT, Hong S, et al. Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2001; 194: 1801-11.
- 14) Jahng AW, Maricic I, Pedersen B, et al. Activation of natural killer T cells potentiates or prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2001; 194: 1789-99.
- 15) Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing Th2 bias of natural killer T cells. *Nature* 2001; 413: 531-4.
- 16) Chiba A, Oki S, Miyamoto K, et al. Suppression of collagen-induced arthritis by natural killer T cell activation with OCH, a sphingosine-truncated analog of alpha-galactosylceramide. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 305-13.

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

——多発性硬化症の糖脂質療法

Therapeutic potential of glycolipid ligands for NKT cells in the suppression of multiple sclerosis



三宅 幸子

Sachiko MIYAKE

国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部

○NKT 細胞は T 細胞受容体 α 鎖に可変性のない invariant 鎖(マウスでは $V\alpha 14J\alpha 281$, ヒトでは $V\alpha 24J\alpha Q$)を発現し、多型性のない CD1d 分子により提示された糖脂質を抗原として認識するユニークなリンパ球である。T 細胞受容体を介した刺激により IL-4, IFN- γ を短時間で大量に産生することから、その免疫調節機能が注目されている。自己免疫疾患においては α -ガラクトシルセラミドやその誘導體である OCH などの糖脂質を用いて、NKT 細胞を刺激する治療法が注目されている。多発性硬化症のモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎は、Th2 サイトカインを選択的に産生させる糖脂質 OCH によりよく抑制されることから、多発性硬化症の新しい治療薬となる可能性がある。

Key Word : NKT 細胞, glycolipid ligand, OCH, EAE

多発性硬化症は、自己の髄鞘抗原に対する免疫寛容が破綻して起こる自己免疫疾患と考えられている。自己抗原への T 細胞の免疫寛容はまず胸腺での自己反応性細胞の除去により維持される (clonal deletion)。しかし、clonal-deletion は完全でないため、それを逃れた自己反応性 T 細胞が末梢に存在する。末梢ではこれらの自己反応性 T 細胞が自己抗原に対して反応しない、あるいは刺激に対するサイトカイン産生能の変化などが起こって組織傷害を起こさない機構があると考えられる。この末梢での免疫寛容を維持する機構のひとつとして、さまざまな免疫調節細胞による制御が注目されている。それらの調節細胞のなかで、特異的に活性化できる糖脂質抗原がわかっている NKT 細胞が治療標的として有力な候補のひとつと考えられる。本稿では NKT 細胞を標的にした治療法について概説する。

NKT 細胞とそのリガンド

NKT 細胞は NK マーカーを発現する T 細胞で

あり、肝や骨髄に多く存在している¹⁻³⁾。機能的な特徴としては T 細胞受容体 (TCR) を介した刺激により IL-4, IFN- γ を含む多くのサイトカインを短時間で大量に産生することから、感染症、癌免疫、移植などさまざまな場面でその免疫調節機能が注目されている。NKT 細胞の多くは TCR α 鎖に可変性のない invariant 鎖(マウスでは $V\alpha 14J\alpha 281$, ヒトでは $V\alpha 24J\alpha Q$)を発現し、限られた V β 遺伝子(マウスでは V $\beta 8.2$, V $\beta 7$, V $\beta 2$, ヒトでは V $\beta 11$)と会合するため、TCR の可変性が乏しい。また、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス I 類似の CD1d 分子に提示された糖脂質を抗原として認識するのが大きな特徴である。CD1 分子は MHC 分子と異なり多様性がないため、同一種内では共通である。NKT 細胞の糖脂質抗原としては海綿の成分である α -ガラクトシルセラミド (α -GC) が知られているが⁴⁾(図 1)、 α -GC は哺乳類の体内に存在することは証明されていない。NKT 細胞の生体内での抗原がなにかについてはまだ不明であるが、ヒトの臍帯血中の NKT 細胞や、germ free

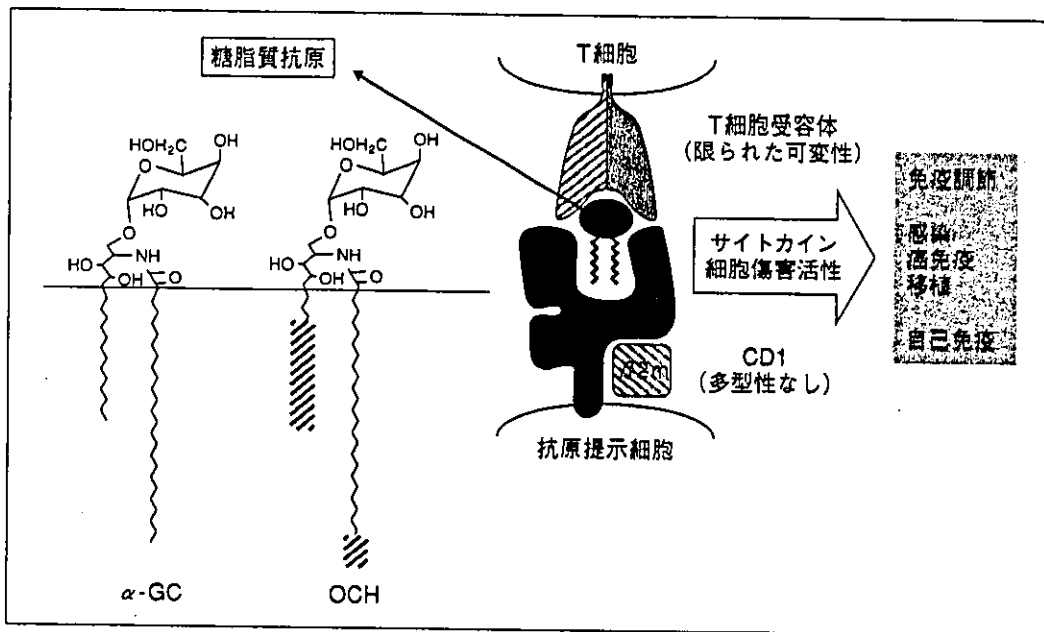


図 1 NKT 細胞による免疫調節

NKT 細胞は可変性の限られた T 細胞受容体を発現し、多型性のない CD1 分子に提示された糖脂質抗原を認識する。刺激によって、ただちにサイトカインを産生し、さまざまな局面で免疫調節を行う。糖脂質抗原としては、 α -ガラクシルセラミド(α -GC)が知られている。そのスフィンゴシン鎖短縮体は Th2 サイトカインを選択的に産生させるユニークな抗原である。

マウスの NKT 細胞もすでにメモリーマーカーが陽性であることから、何らかの自己抗原を認識しているのではないかと考えられている。

現在 NKT 細胞の活性化にもっともよく用いられているのは α -GC であるが、 α -GC は NKT 細胞を刺激して IL-4, IFN- γ を産生させる。多発性硬化症 (MS) をはじめとする臓器特異的自己免疫疾患は、多くの場合、IL-4 などの Th2 サイトカインが疾患抑制的に作用し、IFN- γ などの Th1 サイトカインは疾患を増悪させると考えられている。そこで、著者らは NKT 細胞を刺激して疾患抑制的な Th2 サイトカインを選択的に産生させることができる糖脂質を探索したところ、 α -GC の誘導体のひとつ (OCH) がこのような性質をもつことがわかった (図 1)⁵⁾。OCH は α -GC のスフィンゴシン鎖を短くした誘導体である (図 1)。C57BL/6 (B6) マウスに α -GC を投与すると、IL-4 だけでなく IFN- γ も上昇するが、OCH を投与すると血清中の IL-4 が選択的に上昇する。NKT ノックアウトマウスでは OCH や α -GC 投与による血中サイトカインの上昇はみられないことから、NKT 細胞を介すると考えられる。構造的には OCH は α -

GC のスフィンゴシン鎖が短縮されている。そのため CD1d との結合安定性が α -GC に比較して弱く、NKT 細胞の刺激時間が短くなり、IFN- γ 産生に十分なシグナルが入らないために、IL-4 の産生のみが起こる。CD1d と OCH の結合が α -GC と若干異なり、T 細胞に認識される糖部分が三次元的に異なって提示されるという可能性は否定できないが、詳細については結晶構造解析など、今後の研究が待たれる。

NKT 細胞と多発性硬化症

NKT 細胞と自己免疫疾患との関係では MS^{6,7)}、1 型糖尿病 (IDDM)⁸⁾、進行性全身性硬化症⁹⁾、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、Sjögren 症候群¹⁰⁾ などの末梢血中でその数が減少していることが報告されている。またこれらの全身性自己免疫疾患では NKT 細胞の代表的な糖脂質リガンドである α -GC (図 1) に対する反応が低下していることが報告されている¹⁰⁾。また、Wilson らは、1 型糖尿病から樹立した NKT 細胞クローンは IFN- γ 産生に傾いていることなど機能的な異常を報告し、NKT 細胞が自己免疫疾患病態に何らかの

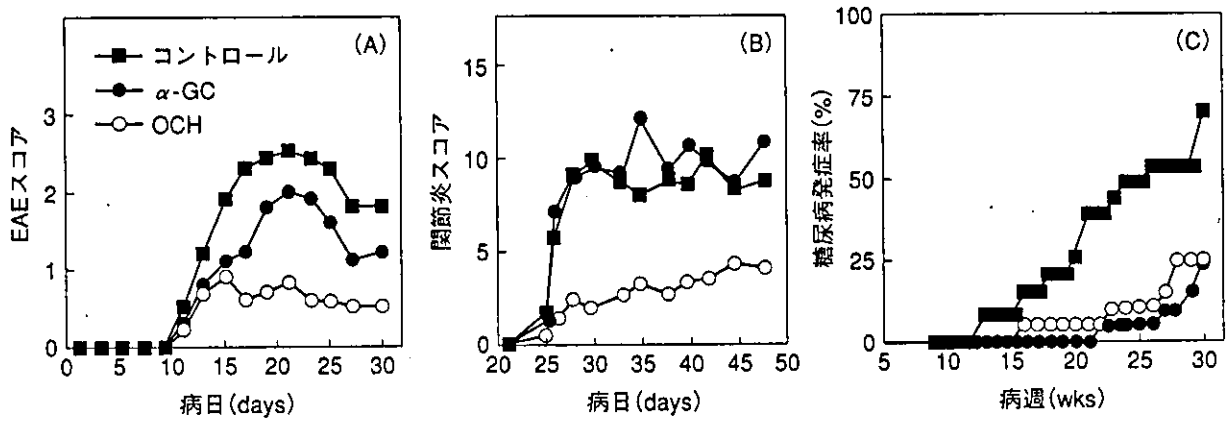


図 2 糖脂質抗原による自己免疫疾患モデルの抑制

A: EAE(B6). B6 マウスに MOG35-55 ペプチド免疫で誘導した EAE は、誘導時の OCH 投与によって制御される。
 B: コラーゲン関節炎(SLJ). SJL マウスにタイプII コラーゲンを免疫して誘導した関節炎は、ブースト時の OCH 投与によって抑制される。
 C: NOD マウスにおける 2 型糖尿病. NOD マウスに 4 週齢から α -GC もしくは OCH を投与すると糖尿病発症が抑制される。

形で関与することが推測されている⁸⁾。ただし、IDDM では NKT 細胞数の減少が追試できないという報告があり^{11,12)}、また健常人の CD4⁻CD8⁻ NKT 細胞(DN-NKT 細胞)は通常 IL-4 を産生しない¹³⁾にもかかわらず、Wilson らの報告では IL-4 が検出されていることなどから、彼らの結果が疑問視されるなど渾沌とした状況になっている。

荒木、山村らは寛解期にある MS 患者では健常人と比較して NKT 細胞は減少しているが、再発期にはむしろ減少が軽度であることを報告している⁶⁾。この際減少しているのは DN-NKT 細胞であり、CD4⁺NKT 細胞は寛解期、再発時ともに減少していなかった。サイトカイン産生に関しては、DN-NKT 細胞では寛解期に IL-4、IFN- γ ともに産生の低下がみられたが、CD4⁺NKT 細胞では寛解期にむしろ IL-4 の産生亢進がみられた。実際に自己免疫疾患において NKT 細胞がどのような機能を果たしているかについては不明であるが、MS 寛解期には IFN- γ などのサイトカインを産生する DN-NKT 細胞数が減少し、DN-NKT 細胞から産生されるサイトカインも減少し、残存している CD4⁺NKT 細胞の IL-4 産生能があがっていることを考えると、MS 寛解期において NKT 細胞は疾患を抑制するように働いていることが推定される。

自己免疫疾患の動物モデルにおける NKT 細胞

については、全身性エリテマトーデスの自然発症モデルである MRL lpr/lpr や NZB/WF1、1 型糖尿病の自然発症モデルである NOD マウスなどで NKT 細胞が減少していることが報告されている。とくに NOD マウスでは精力的に研究が進んでおり、NKT 細胞の移入や、V α 14-J α 281T 細胞受容体遺伝子導入により NKT 細胞を増加させると糖尿病発症を阻止することなどが示されている^{14,15)}。

実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)における糖脂質療法

EAE は MS の動物モデルで、IFN- γ などを産生する Th1 細胞が介在する自己免疫疾患モデルである。EAE に α -GC を投与して NKT 細胞を活性化することによる EAE の抑制効果は、投与方法によっては有効であるとする報告がある^{16,17)}が、抗原免疫時にアジュバントとともに投与するという、臨床的には投与法の難しい方法である。著者らは、IL-4、IFN- γ などのノックアウトマウスを使った一連の解析の結果、 α -GC が腹腔内投与で EAE に無効である理由は、NKT 細胞に Th1 抑制的な IL-4 だけでなく、Th1 促進的な IFN- γ の産生を促すためであると考えられた¹⁸⁾。そこで、NKT 細胞に IL-4 だけを産生させることができれば EAE は抑制できると考え、NKT 細胞に選択的

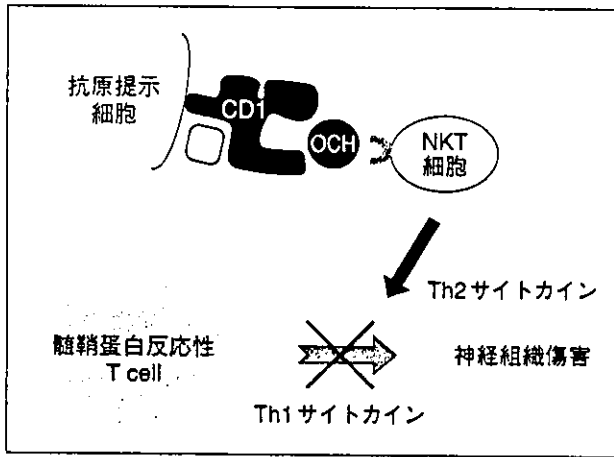


図3 糖脂質抗原による多発性硬化症抑制機序
多発性硬化症は髄鞘蛋白反応性のTh1型細胞によって病態が増悪すると考えられる。OCHはCD1分子によって提示され、NKT細胞を刺激してTh2サイトカインを産生させ、Th1細胞によって引き起こされる病態を抑制すると考えられる。

にIL-4産生を促してEAEを抑制するような方法を検討した。B7.2などの副刺激を抗体で抑制した状態で α -GCをパルスした抗原提示細胞を移入すると、NKT細胞はIL-4を優位に産生し(Th2偏倚)、EAEの発症も予防できることがわかった¹⁸⁾。

しかし臨床応用を考えると細胞移入という手法はやや煩雑であるため、NKT細胞をTh2偏倚させる糖脂質リガンドの探索を試み、 α -GCの誘導体のひとつ(OCH)がこのような性質をもつことがわかった(図1)⁵⁾。その選択的なIL-4誘導能に一致してOCHをEAE誘導時に経口投与すると、EAEは強く抑制された(図2)。また、OCH投与群では免疫源であるmyelin oligodendrocyte glycoprotein(MOG)由来のMOGペプチド35~55に対する抗体のアイソタイプを測定すると、抗MOG35-55IgG1が選択的に上昇しており、MOG35-55に対する自己免疫応答がOCHによりTh2に偏倚していた。さらに、OCHの作用がIL-4を介するかどうか検討するために、抗IL-4抗体による中和実験とIL-4ノックアウトマウスを使った実験を行った。その結果、OCHと抗IL-4抗体を同時投与するとEAEの抑制はみられなくなった。IL-4ノックアウトマウスではOCHのEAE抑制効果はみられず、OCHのEAE抑制にはIL-4が重要な役割を果たすことが明らかになった(図3)。

また、SJLマウスにproteolipid protein(PLP)を免

疫して誘導したEAEは上記B6に誘導した単相性のEAEと異なり再発を起こすので、MSの再発寛解型に類似している。さらに、ヒトの自己免疫疾患ではNKT細胞が減少していることが報告されているが、SJLマウスもNKT細胞が少ないことが知られている。そこで、このSJLマウスに誘導したEAEに対する糖脂質リガンドの効果を検討した。 α -GCはやはり無効であったが、OCHは経口投与、腹腔内投与いずれでもEAEをよく抑制し、再発も抑制した。

OCHはEAEばかりでなく、コラーゲン関節炎¹⁹⁾(図2)、DSS誘導性腸炎(上野、未発表)、NODマウスにおける糖尿病発症も抑制し(図2)(水野、三宅、未発表)、広くTh1病に効果がある。NODマウスにおいては従来の報告のように、 α -GCの投与でも糖尿病の発症は抑制されたが(図2)、関節炎やDSS誘導性腸炎では α -GCの効果はみられていない。 α -GCはNODでは効果ははっきりみられるが、他の自己免疫モデルでは効果がまちまちで、自己免疫治療としてはOCHのほうが用途が広いようだ。

MS治療への臨床応用の可能性

これまで、OCHが多発性硬化症をはじめとする臓器特異的自己免疫疾患モデルには有効であることを紹介したが、OCHのような糖脂質が実際に臨床応用できるであろうか。

まず、自己免疫疾患ではNKT細胞数が減少していると報告されているが、このような状態でNKT細胞の刺激は有効であろうか。これについては、NKT細胞の数が少ないSJLマウスにおいてもOCHはEAEを抑制し、さらに再発も抑制していること、またSJLマウスに誘発したコラーゲン関節炎も抑制していること、NKT細胞数の少ない別の系統であるNODマウスで糖尿病発症を抑制していることなどから、NKT細胞数が減少している状態でも効果は期待できると思われる。

つぎに、糖脂質をヒトに投与することの安全性であるが、 α -GCは抗癌剤として治験が開始されており、phase Iでは安全性が確認されている。OCHについてはまだヒトへの投与は検討されていないが、マウスやラットにおいて α -GCより強

い毒性などはみられていない。

ヒト NKT 細胞が OCH に反応するかどうかということも重要な問題である。末梢血から樹立した NKT クローンを用いた実験では OCH には CD4⁺NKT 細胞が特異的に反応し、 α -GC 刺激と比較すると Th2 サイトカインを有意に高く産生することが確認でき、マウス NKT 細胞と類似した効果が期待できる(荒木, 未発表)。

おわりに

NKT 細胞はさまざまな自己免疫疾患や自己免疫モデルで数や機能の異常が指摘されており、自己免疫疾患病態に関与していると考えられる。抗原特異的治療が自己免疫疾患治療の理想であるが、抗原の多様性、抗原提示する MHC 側の多様性、ペプチドに対するアレルギー反応など、実現には克服すべき問題も多いことがわかってきた。自己免疫疾患のような、緩解と増悪を繰り返し、免疫調節の微妙なバランスのうえに成り立っているような病態では、NKT 細胞のような免疫調節細胞を治療標的とすることもひとつのあらたな方向性であると思われる。

糖脂質リガンドは医薬としてみた場合、ペプチド治療の際に問題となる抗原提示分子の多型性を考慮する必要のないことなどから、広く Th1 細胞

の関与する自己免疫疾患に応用できる治療薬となることが期待できる。

文献

- 1) Hammond, K. J. L. and Godfrey, D. I. : *Tissue Antigens*, **59** : 353-363, 2002.
- 2) Kronenberg, M. and Gapin, L. : *Nat. Rev. Immunol.*, **2** : 557-568, 2002.
- 3) Taniguchi, M. et al. : *Ann. Rev. Immunol.*, **21** : 483-513, 2003.
- 4) Kawano, T. et al. : *Science*, **278** : 1626-1629, 1997.
- 5) Miyamoto, K. et al. : *Nature*, **413** : 531-534, 2001.
- 6) Araki, M. et al. : *Int. Immunol.*, **15** : 279-288, 2003.
- 7) Illes, Z. et al. : *J. Immunol.*, **164** : 4375-4381, 2000.
- 8) Wilson, S. B. et al. : *Science*, **391** : 177-181, 1998.
- 9) Sumida, T. et al. : *J. Exp. Med.*, **182** : 1163-1168, 1995.
- 10) Kojo, S. et al. : *Arthritis Rheum.*, **44** : 1127-1138, 2001.
- 11) Oikawa, Y. et al. : *Diabetes Care*, **25** : 1818-1823, 2001.
- 12) Lee, P. T. et al. : *J. Clin. Invest.*, **110** : 793-800, 2002.
- 13) Gumperz, J. E. et al. : *J. Exp. Med.*, **195** : 1-13, 2002.
- 14) Hammond, K. J. L. et al. : *Tissue Antigens*, **59** : 353-363, 2002.
- 15) Wilson, S. B. et al. : *Nat. Rev. Immunol.*, **3** : 211-222, 2003.
- 16) Singh, A. K. et al. : *J. Exp. Med.*, **194** : 1801-1811, 2001.
- 17) Jahng, A. W. et al. : *J. Exp. Med.*, **194** : 1789-1799, 1998.
- 18) Pal, E. J. et al. : *Immunology*, **166** : 662-668, 2001.
- 19) Chiba, A. et al. : *Arthritis Rheum.* (in press)

* * *

な往来を制限している。これを blood-tissue barrier とし、中でも中枢神経系における血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) は、脳の内部環境を維持する上できわめて重要なシステムとして知られている。

BBBの本体は脳毛細血管を構成する内皮細胞である。BBBでは、前述した、①強固な tight junction による細胞間隙の通過制限のほか、② pinocytosis がきわめて少なく、pinocytotic vesicle を介した細胞質内を通る物質通過が制限されていることから、血液から脳へ物質が移行する際には、基本的には脳毛細血管内皮細胞の細胞膜を二回通過する必要がある。

ここで、単純拡散のメカニズムだけで物質が脳に移行するとすると、脂溶性が高く分子量が小さいことが脳内移行の絶対条件になるが、BBBの機能としてはもう一つ、③脳へ栄養物質を供給する (influx) 輸送系と、脳から血液方向への排出 (efflux) 輸送系の二つが存在していることが挙げられ、分子量と脂溶性だけでは脳内への移行性は判断できない。

上記の三つの機構を通じて、

血液脳関門の機能



血液脳関門の機能と薬剤や遺伝子のデリバリーについて、最近の知見を東京医歯大・神田隆助教授に。

(新潟県 T)



微小循環系は循環器系の最終目的である物質交換のなされる場である。血液成分から組織に必要な物質を円滑に移行させ、かつ組織から出る老廃物を効率よく回収するため、多くの臓器における微小血管系の血管内皮細胞は有窓であるが、体内の限られた部位においては微小循環系構成内皮細胞は隣接する細胞間で tight junction を構成して、物質の自由

BBBは脳に必要なもの、不要ものをきわめて能率よく弁別しているが、脳腫瘍などの治療で脳へ高濃度の治療薬を集中させたい、あるいはBBBを越えて神経細胞あるいは星状膠細胞に遺伝子を導入したいなどの目的を達成するためには、このBBBの存在が避けて通れない障壁となる。

近年、③のBBBを介した輸送系に関する知見が飛躍的に増加している。そのいくつかについて紹介する。脳内への治療薬導入という意味から、今後さらに注目を集めると考えられるのは、後述(2)のinflux輸送系である。

(1) 薬物・脳内代謝物質の排泄輸送系 (efflux transporter)

BBBのeffluxトランスポーターの基質となる薬物は、脂溶性が高くても脳内濃度は低く抑制される。P-糖蛋白(MDR1)はピンクリスチン、ビンブラスチン、シクロスポリンなどを基質とする代表的なeffluxトランスポーターで、いったん脳内へ入ったこれらの抗癌剤は脳から血管内へと汲み出され、最終的な脳内濃度は低値に抑えられる。γ-アミノ酪酸(GABA)、セロトニン、ノルエピネフ

リン、ドーパミン酸などの神経伝達物質、あるいはその代謝産物(ホモバニリン酸など)などに対しても独自の排出システムが存在し、過剰な神経伝達物質が脳内に貯留しないよう脳保護システムとして働いている。

(2) 中枢への移行を支援する輸送系 (influx transporter)

BBBには脳内で多量に消費されるグルコースを運ぶグルコーストランスポーター(GLUT)、ドーパを脳内へと運ぶ中性アミノ酸トランスポーター(LATI)など多数のcarrier-mediated transport (CMT)と呼ばれるシステムが存在することが明らかになっている。

神経変性疾患や脳腫瘍に対し、有効な治療薬を経静脈的に有効量脳内へ到達させるに当たって、この輸送系は最も注目されるが、これらの多くは水溶性の低分子物質やビタミンを対象としたもので、例えば薬物となるペプチドにグルコースをくっつけたものを作成してもGLUTはペプチドを認識できないため、このシステムに乗せて薬物を運搬することはできない。また、薬物の脂溶性を増す、あ

るいは薬物に陽性の電荷を与える(内皮細胞上の陰性電荷と結合)、transcytosisによって輸送されるabsorptive-mediated endocytosis; AMEのメカニズムを利用する)こともBBBでの透過性を増し、薬物の脳内濃度を上昇させる手技として期待されていたが、どちらも同時に全身末梢臓器での薬物吸収を増してしまつたため、血中濃度が低下し、結局は臨床的に応用しうる方策にはなりえないと考えられている。

現在有力な戦略として期待されているのはreceptor-mediated transport (RMT)を介したドラッグデリバリーである。トランスフェリンやインスリンはBBB上に存在するトランスフェリンレセプター、インスリンレセプターとそれぞれ結合し、RMTを介して脳内へと輸送される。UCLAのPartridgeらのグループは、トランスフェリンレセプターに対するモノクローナル抗体を結合させたポリエチレングリコール化イムノリポソーム中にプラスミドDNAを封入したものを作成、静脈投与で有効な脳内遺伝子移行を報告している。

(文 献)

- 1) Partridge WM: Neuron 36(4): 555, 2002.
- 2) 大槻純男, 堀 里子, 寺崎哲也: 日薬理誌 122: 55, 2003.
- 3) 神田 隆: 日本臨床 61: 1402, 2003.

東京医歯大大学院
脳神経機能病態学助教授 神田 隆