

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山村 隆

平成18年(2006)年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

- $V\alpha 19J\alpha 33T$ 細胞を標的とした治療法開発に関する研究 ----- 7
国立精神・神経センター神経研究所 三宅 幸子
- 「 $V\alpha 19 - J\alpha 33$ 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」 ----- 12
三菱化学生命科学研究所 島村 道夫
- ドーパミン脱入力による神経炎症の亢進 ----- 19
東京都精神医学総合研究所 秋山 治彦
- ヒト脳毛細血管内皮細胞の条件的不死化による in vitro BBB model の樹立 ----- 22
山口大学医学部脳神経病態学神経内科 神田 隆
- 多発性硬化症患者血清中の抗 Nogo 受容体抗体の検出 ----- 28
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 ----- 34

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 36

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総括研究報告書

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长

研究要旨：生体内にはさまざまな免疫制御システムが存在する。本研究では、免疫制御システムの理解を深め、その変調の矯正あるいは機能促進によって多発性硬化症（MS）を治療する方法の開発を目的としている。初年度から MR1 拘束性 NKT 細胞（第二の NKT 細胞；V α 19-J α 33 T 細胞）を介する免疫抑制ネットワークの研究を継続しているが、本年度は、V α 19-J α 33 T 細胞を欠く MR1 ノックアウトマウスでは、MS の動物モデル EAE が重症化することを明らかにし、同細胞が免疫制御機能を担うことを証明した。この作用機序として、ICOS 分子を介した B 細胞 IL-10 産生が重要であることも明らかになった。また V α 19-J α 33 T 細胞の認識する外来リガンドおよび自然リガンドに関する検討や、カテコラミン（CA）系神経支配による免疫制御システムの研究を進め、免疫・炎症反応を抑制する制御システムの解明に向けて、多面的な研究を進めた。

分担研究者

島村 道夫（三菱化学生命科学研究研究所発生免疫研究ユニット 研究推進センター研究員）

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講座神経内科学 教授）

秋山 治彦（（財）東京都医学研究機構東京都精神医学総合研究所神経病理学研究室 参事研究員）

A. 研究目的

多発性硬化症（MS）は、主に若い女性を冒し、近年増加傾向の見られる慢性神経疾患である。自己免疫機序が証明されてから、根本治療に向けた取り組みが盛んであるが、現行の治療法は満足できるレベルに達していない。本研究では、健常人の免疫系に備わっている免疫制御機構を解明し、この機能を促進することによって MS の予防・治療を成功させることをねらっている。特に重要な研究対象は MR1 拘束性 NKT 細胞（第二の NKT 細胞）であ

る。同細胞はマウスでは V α 19-J α 33 インバリアント抗原受容体を発現し、刺激によりすみやかにサイトカインを産生する点がコンベンショナルな NKT 細胞（V α 14-J α 281 NKT 細胞）に類似している。主任研究者らのグループは、同細胞が MS の脳病変や脳脊髄液に集積していることを明らかにし（Illes et al. Int Immunol 2004）、MS の病態制御に重要な役割を果たすことを推測してきた。

本研究プロジェクトでは、この仮説を動物モデル実験的自己免疫性脳炎（EAE）で検証するとともに、同細胞のリガンド探索を通して MS 治療に有用な物質を同定することを中心課題と位置づけている。さらに、本年度は、中枢神経系内の免疫制御システムとしての DA 系などにも注目し、炎症を伴う神経疾患の病態理解に有用な知見を得ることを目的として研究を進めた。

B. 研究方法

EAE 実験：

C57BL/6(B6)マウス、V α 19-J α 33 トランスジェニックマウス（第二の NKT 細胞を過剰発現する）、または MR1 ノックアウトマウス（第

二の NKT 細胞を欠損する) に、脳炎惹起性の MOG₃₅₋₅₅ ペプチド 100 μg と結核死菌をフロイト不完全アジュバントに加え、このエマルジョンで感作した。初回感作時及び 48 時間後に、百日咳毒素 200 ng/匹を腹腔内投与した。臨床症状評価については以下のスコアを用いた。(0:正常、1:尾のトーンス低下、2:尾の完全下垂、3:歩行異常、4:後足の完全脱力、5:前足を含む後足の完全脱力、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抽出し、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。

第二の NKT 細胞の作用メカニズム研究:

CD1d ノックアウトマウスと交配した Vα19-Jα33 トランスジェニックマウスの肝臓リンパ球から NK1.1⁺CD3⁺細胞を分離して、第二の NKT 細胞として用いた。他方、MOG₃₅₋₅₅ ペプチドで感作した B6 マウス、B 細胞欠損マウス、または MR1 ノックアウトマウスの脾細胞を調製し、第二の NKT 細胞と 4:1 の比で混合培養し、MOG₃₅₋₅₅ ペプチドで刺激した。48 時間培養後に、上清中の各種サイトカインを測定し、さらに細胞内サイトカイン発現をフローサイトメーターで解析した。

第二の NKT 細胞の自然リガンド研究:

TCRα ノックアウトを背景に持つ Vα19-Jα33 トランスジェニックマウスから、第二の NKT 細胞を分離し、それを MR1 発現細胞 MEB-4 株あるいは同セラミドグルコシル転移酵素 (β-GlcCer synthase) 欠損株と混合培養し、培養上清中の IL-4 と IFN-γ を測定した。あわせて、Raji 細胞株と GPI アンカー合成関連酵素 PIG-L の欠損株も用いて同様のアッセイを行った。

DA 神経系炎症制御に関する研究:

ラット脳に炎症性モデル脳病変を導入し、グ

リア細胞と神経細胞の変化を免疫組織化学的に検討した。一側のカテコラミン (CA) 系神経支配を低下させる目的で、内側前脳束へ 6-hydroxydipamine (6-OHDA) を注入した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、各施設の動物実験規則に従い、動物実験委員会による実験計画書の承認を受けた上で行ったものである。

C. 研究結果

EAE 実験:

昨年度までに得られた予備的実験の追試を行い、第二の NKT 細胞を過剰発現する Vα19-Jα33 トランスジェニックマウスでは、野生型 B6 マウスに比較して EAE の重症度が有意に低下することを確認した。また、CD1d 拘束性 Vα14NKT 細胞が存在しない CD1d ノックアウトマウスに交配した Vα19-Jα33 トランスジェニックにおいても、EAE の重症度は有意に低いことを確認した。一方、第二の NKT 細胞を欠損する MR1 ノックアウトマウスでは、EAE の重症度は有意に悪化した。EAE 症状の悪化した同マウスにおいて抗原特異的 T 細胞のサイトカイン産生を評価したところ、IFN-γ の著明な上昇 (30 倍~) を認めた。しかし、最近 EAE における役割が強調される IL-17 については、ほとんど変化を認めなかった。

第二の NKT 細胞の作用メカニズム研究:

抗原感作脾細胞と第二の NKT 細胞を共培養すると、上清中に IL-10 が検出されることがわかった。フローサイトメーター解析により、IL-10 産生細胞は B 細胞と NKT 細胞であることがわかった。さらに、分離した B 細胞と第二の NKT 細胞を共培養しても IL-10 産生が誘導されることや、B 細胞欠損マウスの脾臓細胞と第二の NKT 細胞の共培養では IL-10 産生が誘導されないことから、B 細胞の重要性がクローズアップされた。この実験系に抗 ICOS 抗体を添加すると B 細胞の IL-10 産生がみられないことから、ICOS 分子が Vα19-Jα33T 細胞を介する免疫制御において重要で

あると考えられた。

第二の NKT 細胞の自然リガンド研究：

第二の NKT 細胞と MR1 発現細胞を共培養し、外から α -mannosylceramide を添加すると、有意な IL-4 および IFN- γ 産生を認める。しかし、 α -mannosylceramide のない条件でも、やや弱い有意なサイトカイン産生を認め、第二の NKT 細胞が MR1 に提示された内因性リガンドに反応している可能性が推測される。今回、セラミドグルコシル転移酵素欠損細胞株、GPI アンカー合成関連酵素 PIG-L の欠損株を用いて実験を行ったが、これらのミュータントを用いても、野生株と同様のサイトカイン産生が誘導できた。このことは、第二の NKT 細胞の内在性リガンドが、セラミドグルコシル転移酵素以外によって合成される可能性、あるいは、動物細胞では発現の確認されていない GPI アンカー以外の α -mannosylated PI である可能性を示唆する。

DA 神経系炎症制御に関する研究：

6-OHDA 投与から 17 か月後に LPS の腹腔内投与を行い、24 時間後の脳を解析した。CA 系脱入力側の線状態では、CR3・MHC クラス II 染色において、健常側よりも多数の活性化ミクログリアおよび Fos/FLA 陽性神経細胞を認めた。この結果から、CA 神経が中枢神経内の炎症制御に関与する可能性が示された。

D. 考察

本研究プロジェクトは、第二の NKT 細胞が MS 病変に浸潤しているという観察を発端として発展し、約 3 年間の研究により同細胞が自己免疫性炎症を制御する免疫制御性細胞であることが明らかになった (Nature Immunol 投稿中)。これまで MS に関係する免疫制御性細胞として、NK 細胞、CD1d 拘束性 NKT 細胞、CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞などが報告されているが、第二の NKT 細胞は腸内細菌に依存性であるなどのユニークな性質を持ち、自己免疫疾患と環境因子の関係を解き明かす鍵を握る細胞であると考えられる。

第二の NKT 細胞の対応抗原としては、 α -mannosylceramide がその一つであることがわかった。古典的 CD1d 拘束性 NKT 細胞の研究では、対応抗原の中から MS に対する治療活性を持つ物質 OCH が同定できた (Miyamoto, Miyake & Yamamura 2001)。第二の NKT 細胞についても、対応抗原の研究が画期的な治療薬の開発につながる可能性が高く、今後の発展が期待される。

免疫制御機構の研究は、従来、免疫細胞間相互作用を対象とするものに限られていたが、これからは神経細胞・免疫細胞相互作用の研究が重要になる。国立精神・神経センターではニューロペプチド Y による免疫制御機構の存在を明らかにしているが、その関連研究として秋山博士は CA 神経による炎症制御機構の研究を進めた。炎症性神経疾患におけるニューロトランスマッターの役割を示した点が意義深い。

E. 結論

MS の病変部位に浸潤する第二の NKT 細胞 (V α 19-J α 33T 細胞) は、脳炎を惹起する自己反応性 T 細胞を抑制する能力を持ち、中枢炎症の制御において重要な役割を果たすことが明らかになった。一方で、中枢神経内におけるトランスマッター (CA) やコトランスマッター (NPY) も炎症制御能力を持つことがわかった。以上の研究は、MS 病態の理解や治療法開発につながる重要な成果であり、厚生労働科学の発展に貢献するものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 V α 14 NKT cells in mice. **Inflamm. Bowel Disease** 11(1): 35-41, 2005
- 2) Hashimoto D, Asakura S, Miyake S, Yamamura T, van Kaer L, Liu C, Tanimoto M and Teshima T. 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: 551-6, 2005
 - 3) Murata K, Toba T, Nakanishi K, Takahashi B, Yamamura T, Miyake S and Annoura H. Total synthesis of an immunosuppressive glycolipid, (2S,3S,4R)-1-O-(α -D-galactosyl)-2-tetracosanoylamino-1,3,4-nonanetriol. **J.Org.Chem.** 70(6): 2398-401, 2005
 - 4) Yu KOA, Im JS, Molano A, Dutronc Y, Illarionov PA, Forestier C, Fujiwara N, Arias I, Miyake S, Yamamura T, Chang YT, Besra GS, and Porcelli SA. Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of α -galactosylceramides. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA.** 102(9): 3383-8, 2005
 - 5) Ota T, Takeda K, Akiba H, Hayakawa Y, Ogasawara K, Ikarashi Y, Miyake S, Wakasugi H, Yamamura T, Kronenberg M, Raulet DH, Kinoshita K, Yagita H, Smyth MJ, Okumura K. IFN- γ -mediated negative feedback regulation of NKT-cell function by CD94/NKG2. **Blood**, 106(1): 184-92, 2005
 - 6) Chiba A, Kaieda S, Oki S, Yamamura T and Miyake S. The involvement of V α 14 NKT cells in the pathogenesis of arthritis in murine models. **Arthritis Rheum.** 52(6):1941-8, 2005
 - 7) Toba T, Murata K, Yamamura T, Miyake S and Annoura H. A concise synthesis of (3S,4S,5R)-1-(α -D-galactopyranosyl)-3-tetracosanoylamino-4,5-decanediol, a C-glycoside analogue of immunomodulating α -galactosylceramide OCH. **Tetrahedron Letters** 46: 5043-7, 2005
 - 8) Ronet C, Darche S, de Moraes ML, Miyake S, Yamamura T, Louis JA, Kasper LH, Buzoni-Gatel D. NKT Cells Are Critical for the Initiation of an Inflammatory Bowel Response against *Toxoplasma gondii*. **J.Immunol.**175: 899-908, 2005
 - 9) Oki S, Tomi C, Yamamura T and Miyake S. Preferential Th2 polarization by OCH is supported by incompetent NKT cell induction of CD40L and following production inflammatory cytokines by bystander cells in vivo. **Int.Immunol.** 17(12):1619-29, 2005
 - 10) Okamoto N, Kanie O, Huang Y.Y, Fujii R, Watanabe H, and Shimamura M. Synthetic α -mannosyl ceramide as a potent stimulant for an NKT cell repertoire bearing the invariant V α 19-J α 26 TCR α chain. **Chemistry & Biology** 12: 677-683, 2005
 - 11) Shimamura M, Okamoto N, Huang Y-Y, Yasuoka J, Morita K, Nishiyama A, Amano Y and Mishina T: Induction of promotive rather than suppressive immune responses from a novel NKT cell repertoire V α 19 NKT cell with α -mannosylceramide analogies consisting of the immunosuppressant ISP-I as the sphingosine unit.

Eur. J. Med. Chem. (in press)

- 12) Satoh J, Onoue H, Arima K and Yamamura T: Nogo-A and Nogo receptor expression in demyelinating lesions of multiple sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64(10):129-138, 2005

総論

- 1) 山村 隆:ニューロペプチドYと免疫制御. *アレルギー科.* 19(6):538-542, 2005
- 2) 山村 隆:多発性硬化症とNK細胞. *Current Insights in Neurological Science* 13: 10-11, 2005
- 3) 山村 隆:ニューロペプチドYと免疫制御. *臨床免疫* 44: 324-327, 2005
- 4) 山村 隆:糖脂質による新しい治療. *臨床神経* 45:909-911, 2005
- 5) Miyake S and Yamamura T: Therapeutic potential of glycolipid ligands for natural killer (NK) T cells in the suppression of autoimmune diseases. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 5 (3): 315-22, 2005
- 6) 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): 546-51, 2004
- 7) 三宅幸子: α -ガラクトシルセラミドとその誘導体 *分子リウマチ* 2(1): 39-46, 2005
- 8) 三宅幸子: 免疫調節細胞と自己免疫疾患 *Mol. Med.* 42(4): 385-91, 2005
- 9) 三宅幸子: 自己免疫病態調節と治療標的

としての NKT 細胞 *医学のあゆみ* 213(1): 59-63, 2005

- 10) 三宅幸子: OCH と CD1D *炎症と免疫* 13(4): 134-6, 2005
- 11) 三宅幸子: 多発性硬化症 *最新医学* 60(6): 183-92, 2005
- 12) Akiyama H, Uchikado H: Brain inflammation and psychogeriatric diseases. In: I. Hanim, R. Cacabelos & A. Fisher eds. "Progress in Alzheimer's and Parkinson's Diseases" pp139-144, Taylor & Francis, London, 2005
- 13) 秋山治彦: アルツハイマー病とミクログリア, *神経研究の進歩* 49(3):347-356, 2005

2. 学会発表

- 1) Kaieda S, Chiba A, Oki S, Yamamura T, and Miyake S. The involvement of CD1-restricted NKT cells in the pathogenesis of collagen-induced and antibody-induced arthritis. 5th Annual Conference of FOCIS, Boston, May 13, 2005
- 2) Sakuishi K, Miyake S, and Yamamura T. Exogenous IL-2 promotes IL-5 production by human CD4+ NKT cell clones: The role of IL-2 in the immune regulation. 5th Annual Conference of FOCIS, Boston, May 13, 2005
- 3) Kaieda S, Oki S, Yamamura T, and Miyake S. A new synthetic glycolipid suppresses murine models of arthritis by blocking of natural killer T cell activation. American College of

- Rheumatology 69th Annual Scientific Meeting, Orlando, Florida. October 25, 2004 (Arthritis Rheum. 52:S445, 2005)
- 4) 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 細胞の糖脂質抗原に対する反応性の検討、第 49 回日本リウマチ学会、横浜、4 月 20 日、2005
 - 5) 海江田信二郎、千葉麻子、Ludovic Croxford, 大木伸司、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 19NKT 細胞の機能解析 第 49 回日本リウマチ学会、横浜、4 月 19 日、2005
 - 6) 水野美歩、大木伸司、海江田信二郎、任海千春、山村隆、三宅幸子：新規糖脂質リガンドによる NKT 細胞を介した病態制御。第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005
 - 7) 塚本和行、林青順、大辻季樹、鶴井博理、三宅幸子、山村隆、広瀬幸子：SLE における NKT 細胞の役割。第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005
 - 8) 任海千春、大木伸司、山村隆、三宅幸子：OCH による NKT 細胞依存性 Th2 誘導における免疫ネットワークの関与、第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005
 - 9) 作石かおり、荒浪利昌、大木伸司、三宅幸子、山村隆：Exogenous IL-2 promotes IL-5 production by human CD4⁺ NKT cell clones: The role of IL-2 in the immune regulation. 第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005
 - 10) Croxford Ludovic, Miyake Sachiko, Shimamura Michio, Yamamura Takashi: V α 19-J α 33 invariant NKT cells regulated experimental autoimmune encephalomyelitis. 第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005
 - 11) 大木伸司、海江田信二郎、山村隆、三宅幸子：新規糖脂質リガンドによる NKT 細胞を介した病態制御—マウス気道アレルギーモデルにおける抑制効果—第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005
 - 12) 海江田信二郎、大木伸司、山村隆、三宅幸子：NKT 細胞活性制御作用を介した新規合成糖脂質によるマウスモデル関節炎の抑制：第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005
 - 13) 島村道夫：新規 V α 19 NKT 細胞の抗原認識。第 35 回日本免疫学会、横浜、12 月 13 日、2005
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

V α 19J α 33T 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：V α 19J α 33T 細胞は、可変性の限られた T 細胞受容体を有し、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。V α 19J α 33T 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。昨年、V α 19J α 33T 細胞受容体のトランスジェニックマウスでは、多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: EAE) が軽症であることを報告した。本年度は、さらに V α 19J α 33T 細胞を欠く MR1 ノックアウトマウスにおける EAE を検討し、重症化することを明らかにした。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、MOG 反応性 T 細胞の IFN- γ 産生抑制がみられ、V α 19J α 33T 細胞は抗原特異的 Th1 細胞の反応を抑制することによって EAE を制御すると考えられる。また、この作用機序として、V α 19J α 33 トランスジェニック/CD1 ノックアウトマウスにおいては IL-10 産生が増加しており、IL-10 産生細胞は細胞内サイトカイン染色法を用いた解析により、主に B 細胞であることがわかった。また、抗 ICOS 抗体存在下で B 細胞と V α 19J α 33 トランスジェニック/CD1 ノックアウトマウスから分離した NKT 細胞を共培養すると、B 細胞からの IL-10 産生増強がみられないことから、ICOS 分子が IL-10 産生には重要であると考えられた。

A. 研究目的

これまで我々は、合成糖脂質を用いて V α 14NKT 細胞を適切に刺激することによって EAE を抑制できることを示し、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。V α 19J α 33T 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 V α 14NKT 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が、V α 19J α 33T 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る。本研究では、V α 19J α 33 トランスジェニックマウスならびに V α 19J α 33T 細胞を欠く MR1 ノックアウトマウスを用いて、EAE

の病態を解析し、自己免疫病態における V α 19J α 33T 細胞の機能について検討する。

B. 研究方法

C57BL/6 (B6) マウス、V α 19J α 33 トランスジェニックマウス、もしくは MR-1 ノックアウトマウスに MOG₃₅₋₅₅ ペプチドを 100 μ g とフロイト不完全アジュバントに結核死菌を加え、エマルジョンを作製し感作した。初回感作時及び 48 時間後に、百日咳毒素 200ng/匹を腹腔内投与した。臨床症状評価については以下のスコアを用いた。(0:正常、1:尾のトーンス低下、2:尾の完全下垂、3:歩行異常、4:後足の完全脱力、5:前足を含む後足の完全脱力、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。サイトカインの細胞内染色については、フローサイトメトリーを用いて解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、当研究所動物実験の規定に従い、実験計画書の承認を受けて行った。

C. 研究結果

V α 19J α 33 トランスジェニックマウスでは、野生型 B6 マウスに比較して EAE の重症度が有意に低かった。また、CD1 拘束性 V α 14NKT 細胞が存在しない CD1 ノックアウトマウスにかけあわせた、V α 19J α 33 トランスジェニック/CD1 ノックアウトマウスにおいても、EAE の重症度が有意に低かった。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、V α 19J α 33 トランスジェニックマウスと野生型 B6 マウスでは有意な差はみられず、V α 19J α 33 トランスジェニック/CD1 ノックアウトマウスと CD1 ノックアウトマウス間においても差はみられなかったことから、MOG 反応性 T 細胞の頻度に変化が生じた結果、EAE の重症度が変化したのではないことが示された。一方、MR1 ノックアウトマウスでは EAE の重症度は悪化した。MOG₃₅₋₅₅ に対する抗体のアイソタイプは、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、IgG1、IgE が有意に高く、MOG₃₅₋₅₅ に対する反応が Th2 に偏倚していることが示された。MOG₃₅₋₅₅ 特異的リンパ球のサイトカイン産生については、V α 19J α 33 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。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、IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-13、IL-6 についてコントロールに比較して有意に産生低下がみられた。IL-4、IL-5 については測定感度以下であった。IL-10 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において産生が増加していた。IL-10 産生細胞は、細胞内サイトカイン染色法を用いた解析により、主に B 細胞であることがわかった。B 細胞と V α 19J α 33 トランスジェニック/CD1 ノックアウトマウスから分離した NKT 細胞を共培養すると、上清中に IL-10 が検出される。この実験系に抗 ICOS 抗体を添加すると B 細胞からの IL-10 産生増強がみられないことから、ICOS 分子が V α 19J α 33T 細胞による B 細胞からの IL-10 産生増強には重要であると考えられた。

D. 考察

これまで、我々は、V α 14NKT 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。V α 19J α 33T 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 V α 14NKT 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、V α 19J α 33T 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。V α 19J α 33T 細胞は、マウスにおいて V α 14NKT 細胞と比較するとその数が少ないことから、V α 19J α 33 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、V α 14NKT 細胞の存在しない V α 19J α 33 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。V α 19J α 33 トランスジェニックマウスでも、V α 19J α 33 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、

V α 19J α 33 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 Th1 反応が抑制されており、V α 19J α 33T 細胞は、抗原特異的 T 細胞の Th1/Th2 分化に影響を与えると考えられた。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 の産生が増加しており、これは主に B 細胞から産生されると考えられた。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、V α 19J α 33T 細胞特異的な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 33T 細胞は、自己反応性 T 細胞の Th1 反応を抑制することによって多発性硬化症モデルである EAE を抑制する。この作用には、ICOS 分子を介した B 細胞からの IL-10 産生が重要である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 11(1): 35-41, 2005
- 2) Hashimoto D, Asakura S, Miyake S, Yamamura T, van Kaer L, Liu C, Tanimoto

M and Teshima T. 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: 551-6, 2005

- 3) Murata K, Toba T, Nakanishi K, Takahashi B, Yamamura T, Miyake S and Annoura H. Total synthesis of an immunosuppressive glycolipid, (2S,3S,4R)-1-O- (alpha-d-galactosyl)-2- tetracosanoylamino-1,3,4-nonanetriol. *J.Org.Chem.* 70(6): 2398-401, 2005
- 4) Yu KOA, Im JS, Molano A, Dutronc Y, Illarionov PA, Forestier C, Fujiwara N, Arias I, Miyake S, Yamamura T, Chang YT, Besra GS, and Porcelli SA. Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of α -galactosylceramides. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 102(9): 3383-8, 2005
- 5) Ota T, Takeda K, Akiba H, Hayakawa Y, Ogasawara K, Ikarashi Y, Miyake S, Wakasugi H, Yamamura T, Kronenberg M, Raulet DH, Kinoshita K, Yagita H, Smyth MJ, Okumura K. IFN- γ -mediated negative feedback regulation of NKT-cell function by CD94/NKG2. *Blood*, 106(1): 184-92, 2005
- 6) Chiba A, Kaieda S, Oki S, Yamamura T and Miyake S. The involvement of V α 14 NKT cells in the pathogenesis of arthritis in murine models. *Arthritis Rheum.* 52(6):1941-8, 2005
- 7) Toba T, Murata K, Yamamura T, Miyake S and Annoura H. A concise synthesis of

(3S,4S,5R)-1-(α -D-galactopyranosyl)-3-tetracosanoylamino-4,5-decanediol, a C-glycoside analogue of immunomodulating α -galactosylceramide OCH. **Tetrahedron Letters** 46: 5043-7, 2005

8) Ronet C, Darche S, de Moraes ML, Miyake S, Yamamura T, Louis JA, Kasper LH, Buzoni-Gatel D. NKT Cells Are Critical for the Initiation of an Inflammatory Bowel Response against *Toxoplasma gondii*. **J.Immunol.**175: 899-908, 2005

9) Oki S, Tomi C, Yamamura T and Miyake S. Preferential Th2 polarization by OCH is supported by incompetent NKT cell induction of CD40L and following production of inflammatory cytokines by bystander cells in vivo. **Int.Immunol.** 17(12):1619-29, 2005

総論

1) Miyake S and Yamamura T. Therapeutic potential of glycolipid ligands for natural killer (NK) T cells in the suppression of autoimmune diseases. **Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.** 5 (3): 315-22, 2005

2) 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) : 546-51, 2004

3) 三宅幸子 : α -ガラクトシルセラミドとその誘導体 **分子リウマチ** 2(1) : 39-46, 2005

4) 三宅幸子 : 免疫調節細胞と自己免疫疾患 **Mol. Med.** 42(4) : 385-91, 2005

5) 三宅幸子 : 自己免疫病態調節と治療標的としての NKT 細胞 **医学のあゆみ** 213(1) : 59-63, 2005

6) 三宅幸子 : OCH と CD1D **炎症と免疫** 13(4) : 134-6, 2005

7) 三宅幸子 : 多発性硬化症 **最新医学** 60(6) : 183-92, 2005

2. 学会発表

1) Kaieda S, Chiba A, Oki S, Yamamura T, Miyake S. The involvement of CD1-restricted NKT cells in the pathogenesis of collagen-induced and antibody-induced arthritis. 5th Annual Conference of FOCIS, Boston, May 13, 2005

2) Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T. Exogenous IL-2 promotes IL-5 production by human CD4+ NKT cell clones: The role of IL-2 in the immune regulation. 5th Annual Conference of FOCIS, Boston, May 13, 2005

3) Kaieda S, Oki S, Yamamura T, Miyake S. A new synthetic glycolipid suppresses murine models of arthritis by blocking of natural killer T cell activation. American College of Rheumatology 69th Annual Scientific Meeting, Orlando, Florida. October 25, 2004 (*Arthritis Rheum.* 52:S445, 2005)

4) 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 細胞の糖脂質抗原に対する反応性の検討、第 49

回日本リウマチ学会、横浜、4月20日、2005

encephalomyelitis. 第35回日本免疫学会、横浜、12月13日、2005

5) 海江田信二郎、千葉麻子、Ludovic Croxford, 大木伸司、山村隆、三宅幸子：マウス関節炎モデルにおける $V\alpha 14$ NKT 細胞ならびに $V\alpha 19$ NKT 細胞の機能解析 第49回日本リウマチ学会、横浜、4月19日、2005

11) 大木伸司、海江田信二郎、山村隆、三宅幸子：新規糖脂質リガンドによる NKT 細胞を介した病態制御—マウス気道アレルギーモデルにおける抑制効果—第35回日本免疫学会、横浜、12月13日、2005

6) 水野美歩、大木伸司、海江田信二郎、任海千春、山村隆、三宅幸子：新規糖脂質リガンドによる NKT 細胞を介した病態制御. 第35回日本免疫学会、横浜、12月13日、2005

12) 海江田信二郎、大木伸司、山村隆、三宅幸子：NKT 細胞活性制御作用を介した新規合成糖脂質によるマウスモデル関節炎の抑制：第35回日本免疫学会、横浜、12月13日、2005

7) 塚本和行、林青順、大辻季樹、鶴井博理、三宅幸子、山村隆、広瀬幸子：SLE における NKT 細胞の役割。第35回日本免疫学会、横浜、12月13日、2005

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし

8) 任海千春、大木伸司、山村隆、三宅幸子：OCH による NKT 細胞依存性 Th2 誘導における免疫ネットワークの関与、第35回日本免疫学会、横浜、12月13日、2005

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

9) 作石かおり、荒浪利昌、大木伸司、三宅幸子、山村隆：Exogenous IL-2 promotes IL-5 production by human CD4+ NKT cell clones: The role of IL-2 in the immune regulation. 第35回日本免疫学会、横浜、12月13日、2005

10) Croxford Ludovic, Miyake Sachiko, Shimamura Michio, Yamamura Takashi: Val9-Ja33 invariant NKT cells regulated experimental autoimmune

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

「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

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、今回まず V α 19 NKT 細胞に対する細胞内在性の自然抗原について検討を加えた。抗原候補物質として見出されている α -マンノシル化糖脂質 (α -ManCer, および α -Man- α -GlcNH₂-PI, (α -Man)₂-PI(PI:phosphatidylinositol))の知見に基づきどの種類の糖脂質が細胞内で合成され MHC 分子 MR1 により提示され invariant TCR により認識されるかを調べた。セラミドにグルコースを転位する酵素、あるいは GPI アンカー生合成酵素の欠損する細胞株から作成した MR1 遺伝子導入株は正常 MR1 遺伝子導入株と比較して遜色ない V α 19NKT 細胞刺激能を示したことから、内在抗原はセラミドグルコシル転位酵素以外により合成される α -マンノシル化スフィンゴ糖脂質、あるいは動物細胞では発現が知られていない GPI アンカー以外の α -マンノシル化 PI であることが示唆された。次に V α 19NKT 細胞の抗原刺激に応答して分泌するサイトカインを特徴づける IL-17 分泌の機構について検討した。V α 19NKT 細胞の抗原刺激を引き金とし、この細胞自身のほか共存する T 細胞も IL-17 を分泌することがわかった。このカスケードは活性化された V α 19NKT 細胞の分泌する液性因子のみで進行することが判明した。

A. 研究目的

V α 19 NKT 細胞の免疫制御機能を活用して難治性の自己免疫性神経疾患の治療法を開発するためにこの細胞の抗原による活性化、およびそれに伴うサイトカインの分泌機構を明確にする必要がある。V α 19 NKT 細胞はあらかじめ抗原を取り込ませることなく抗原提示 MHC 分子である MR1 の遺伝子導入細胞により抗原刺激を受け取ることができる。これは細胞内で合成された内在的抗原を MR1 が提示しそれを invariant TCR

が認識するためと考えられる。この実態を明らかにすることは V α 19NKT 細胞の生体内での免疫系調節機能を知る上で重要な知見となる。そこで抗原活性が認められた α -マンノシル化糖脂質の知見を基に内在抗原の絞り込みを目指した。さらに V α 19NKT 細胞の抗原刺激に応答して分泌する免疫系調節サイトカイン IL-4、IL-5、IL-10、IL-12、IL-17、IFN- γ 等のうち IL-17 の分泌の機構について検討した。これは V α 19NKT 細胞の免疫制御機能に IL-17 の炎症昂進作

用がどのように関与しているのかを明確にすることが必要と考えられるからである。

B. 研究方法

1. $V\alpha 19$ NKT 細胞の MR1 遺伝子導入細胞に対する免疫応答

Invariant $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ 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 ($V\alpha 19$ Tg) マウス (TCR $\alpha^{-/-}$ バックグラウンド) 肝臓リンパ球をリスポンダーとし、X 線照射により増殖を抑制させた MR1 遺伝子導入細胞と共培養後免疫応答を IL-4, IFN- γ 分泌を指標に測定した。MR1 遺伝子導入細胞は B6 マウス細胞からクローニングした MR1 A cDNA を真核細胞発現ベクター (pCXN, 大阪大学 宮崎純一博士より供与) に組み込み、マウスメラノーマ株 B16 の亜株 (MEB-4) 及びそのセラミドグルコシル転位酵素 (β -GlcCer synthase) 欠損株 GM95 (理化学研究所 平林義雄博士より供与)、あるいはヒトパーキット B リンホーマ株 Raji およびその GPI アンカー合成関連酵素のひとつ PIG-L の欠損株 Raji 26 (大阪大学 木下タロウ博士より供与) に導入して作成した。薬剤選択ののち MR1 の発現は Tag の発現および MR1 α 2 ドメイン抗原提示領域と推測される部位のポリペプチドに対して作成した抗血清による選択的染色により確認した。

2. $V\alpha 19$ NKT 細胞の IL-17 分泌機構

$V\alpha 19$ Tg, B6, あるいは $\beta 2m^{-/-}$ マウスから肝臓、あるいは脾臓単核球を密度勾配遠心法で調製し、これらを固相化抗 CD3 抗体

(2C11) 上で培養し、上清の IL-17 を ELISA 法で定量した。細胞内サイトカイン測定は抗 CD3 抗体で刺激した細胞をさらに GolgiPlug 存在下 PMA/ionomycin で 5 時間刺激し Becton Dickinson 社製測定キットを用いて細胞染色後 FACS で分析することにより行った。

(倫理面への配慮)

実験動物は三菱化学生命科学研究所実験動物委員会の指針を遵守し、苦痛を最小限度に止めるよう配慮してこれを取り扱った。遺伝子組み換え実験はカルタヘナ法に基づき定めた当研究所規定を遵守して行った。

C. 研究結果

1. $V\alpha 19$ NKT 細胞の MR1 遺伝子導入細胞に対する免疫応答

$V\alpha 19$ Tg マウス肝臓単核球 (約 30 %の $V\alpha 19$ NKT 細胞を含む) をリスポンダーとしてこれを MR1 遺伝子導入細胞により刺激すると予め α -マンノシル化抗原糖脂質を取り込ませた細胞による刺激よりも減弱するものの免疫応答が明確に観察される。この MR1 遺伝子導入細胞内で合成、プロセスされ MR1 に提示されると考えられる内在性自然抗原についての情報を得るために、 β -GlcCer synthase あるいは PIG-L の欠損株から作成した MR1 遺伝子導入細胞の刺激能を野生型 MR1 遺伝子導入細胞と比較した (図 1)。MR1 遺伝子導入メラノーマ株 (MR1-MEB4) は $V\alpha 19$ Tg マウス肝臓リンパ球に対する刺激能をもち、これは $V\alpha 19$ NKT 細胞の存在比が少ない正常 C57BL/6 マウス肝臓リンパ球 (約 1 %と推測される) に対して

は小さい。このとき β -GlcCer synthase 欠損 MR1 遺伝子導入細胞株 (MR1-GM95) の $V\alpha 19Tg$ マウス肝臓リンパ球に対する刺激能は MR1-MEB4 のものにほぼ匹敵した。一方 GPI アンカー欠損 MR1 遺伝子導入細胞 MR1-Raji26 の $V\alpha 19Tg$ マウス肝臓リンパ球に対する刺激能も野生型 MR1 遺伝子導入細胞 MR1-Raji に遜色ない刺激能が見られた。これらのことから内在抗原はセラミドグルコシル転位酵素以外により合成される α -マンノシル化スフィンゴ糖脂質、あるいは動物細胞では発現が知られていない GPI アンカー以外の α -マンノシル化 PI であることが示唆された。

2. $V\alpha 19$ NKT 細胞の IL-17 分泌機構

$V\alpha 19Tg$ マウス肝臓細胞は B6 マウス細胞に比べ抗 CD3 抗体コートしたプレート上での培養により invariant TCR への刺激を入れると培養 2 日目以降で高い IL-17 分泌能を示した。このとき NK1.1+細胞を除去してから培養すると IL-17 の分泌は大きく減少し、また $V\alpha 19NKT$ 細胞特異的な抗原活性のあるセラミド修飾 α -ManCer (Man4PhC16) や α -Man- α -GlcNH₂-PI による刺激により IL-17 分泌が見られた。in vivo においても抗 CD3 抗体投与後 24 時間をピークとして $V\alpha 19 Tg$ マウスでは B6 マウスに比べ顕著な血清 IL-17 濃度の上昇が見られた。これらのことから $V\alpha 19NKT$ 細胞の抗原刺激を引き金とした IL-17 分泌の機構の存在が示唆された。

細胞内 IL-17 染色実験の結果、抗 CD3 抗

体刺激 3 日後の $V\alpha 19Tg$ マウス脾臓細胞では NKT 細胞の 10%, T 細胞の 30% が IL-17 を内包しており、これは B6 細胞 (T 細胞の 15%) に比べ有意に高い割合だった。このことから $V\alpha 19$ NKT 細胞の活性化を引き金とする IL-17 の分泌機構ではシグナルが T 細胞に伝達されるカスケードが存在し、分泌の主体は少なくとも脾臓細胞では NKT 細胞の数十倍存在する T 細胞であることが示唆された。

そこでどのように $V\alpha 19NKT$ 細胞の抗原刺激が T 細胞に伝達されるかを知るために TCR への刺激で活性化させた $V\alpha 19$ NKT 細胞をナイーブの細胞と共培養させたときの効果を検討した。 $V\alpha 19 Tg$, および B6 マウス肝臓細胞を抗 CD3 抗体コートプレート上で 1 日培養して活性化させ、これを細胞と上清に分画した。別に調製した $V\alpha 19 Tg$, B6, および $\beta 2m^{-/-}$ マウス脾臓細胞をリスポンダーとしてこれに 1/5 数の活性化肝臓細胞あるいは 1/3 v/v の培養上清の添加後、抗 CD3 抗体の刺激はなしで 2 日間培養し、上清の IL-17 を分析した (図 2)。その結果興味深いことに活性化 $V\alpha 19$ NKT 細胞の培養上清の添加のみによりナイーブ脾臓細胞の IL-17 分泌が誘導されることが判明し、一方活性化肝臓細胞は TCR への刺激が途切れると刺激能が消失していることがわかった。

D. 考察

$V\alpha 19$ NKT 細胞が認識する内在性の自然抗原の決定はこの細胞の生体内での活性化

の機構を知る上で重要である。今回検討した結果では β -GlcCer synthase 欠損によりやや MR1 遺伝子導入細胞の $V\alpha 19$ NKT 細胞刺激能が低下する傾向が認められたもののこれが α -マンノシル化されたスフィンゴ糖脂質かあるいは PI 誘導體か、の決定には至らず、引き続いての検討が必要となった。 α -マンノシル化スフィンゴ糖脂質として可能性が残されたのはセラミドグルコシル転位酵素以外により合成されるスフィンゴ糖脂質であり、現在は未発見のセレブロシド (β -GalCer) が α -マンノシル化された糖脂質あるいは未知の合成酵素により作られた α -ManCer そのものなどが候補となる。PI 誘導體としては微生物細胞壁を構成するリポアラビノマンナン様の物質、酵母等での発現が知られる α -マンノシル化 PI のジアシルグリセロールをセラミドに置換した化合物など動物細胞では現在発現が知られていない物質が考えられる。

IL-17 は炎症昂進性のサイトカインとして T 細胞が分泌することが報告されている。 $V\alpha 19$ NKT 細胞の抗原刺激を引き金としてそれ自身、およびその共存により T 細胞が IL-17 分泌することが明らかとなった。このとき、 $V\alpha 19$ NKT 細胞の分泌する液性因子が IL-17 分泌に重要なことがわかった。これは IL-17 分泌ヘルパー T 細胞の分化に機能する IL-23 ではないことは確かめられた。この因子は B6 肝臓細胞の活性化によっても産生され、この細胞の培養上清は $V\alpha 19$ Tg 肝臓細胞培養上清と同程度の効力で $V\alpha 19$ Tg 脾臓細胞の IL-17 分泌を誘導

した。しかし B6 肝臓細胞培養上清は $V\alpha 19$ Tg 肝臓細胞培養上清とは異なり B6 や $\beta 2m^{-/-}$ 脾臓細胞の IL-17 の分泌は誘導できなかった。一方 $V\alpha 19$ Tg 肝臓細胞培養上清でも $V\alpha 19$ Tg 脾臓細胞に対してより有効に IL-17 の分泌を誘導した。これらの結果から IL-17 の分泌機構を導くには更なる検証が必要であるが、液性因子を介した細胞間相互作用の重要性が明らかになった。

今回の知見は見かけ上 $V\alpha 19$ NKT 細胞の活性化は臓器特異的炎症性自己免疫疾患を増悪させる方向に機能すると考えられる。しかし実際には EAE モデルにおいて $V\alpha 19$ NKT 細胞の過剰発生は病状の抑制に働く (三宅、山村ら)。分泌の局在や条件によるサイトカインスペクトラムの変化などを考慮して多面的に $V\alpha 19$ NKT 細胞の寄与をとらえる必要がある。

E. 結論

$V\alpha 19$ NKT 細胞の認識する内在性自然抗原は既知の天然物質からは絞りだせなかった。 $V\alpha 19$ NKT 細胞の免疫系調節を仮定するならば内在抗原は存在し、これの決定はこの細胞の機能を制御するのに重要となる。継続した努力が必要である。

$V\alpha 19$ NKT 細胞による免疫系制御の鍵を握る抗原刺激に応答したサイトカインの分泌を特徴づける IL-17 の産生機構の一端が明らかになった。抗原刺激に続く何らかの液性因子の働きが実質的な IL-17 産生エフェクター細胞の活性化に重要なことが明らかになった。今後いくつかの検証実験を重

ね、V α 19 NKT 細胞が関与する IL-17 分泌機構の実態を明確にしていきたい。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Synthetic α -mannosyl ceramide as a potent stimulant for a novel NKT cell repertoire bearing the invariant V α 19-J α 26 TCR α chain.

Naoki Okamoto, Osamu Kanie, Yi-Ying Huang, Rei Fujii, Hiroko Watanabe, and Michio Shimamura

Chemistry & Biology 12: 677-683 (2005)

2. Induction of promotive rather than suppressive immune responses from a novel NKT cell repertoire V α 19 NKT cell with α -mannosyl ceramide analogues consisting of the immunosuppressant ISP-I as the sphingosine unit.

Michio Shimamura, Naoki Okamoto, Yi-Ying Huang, Jouji Yasuoka, Kenji Morita, Akira Nishiyama, Yuusuke Amano, and Tadashi Mishina

Eur. J. Med. Chem. (in press)

2. 学会発表

1. 「新規 V α 19NKT 細胞の抗原認識」

島村道夫

第34回日本免疫学会総会 横浜。

2. V α 19-J α 33 invariant NKT cells regulate experimental autoimmune encephalomyelitis.

Ludovic Croxford, Sachiko Miyake, Michio Shimamura, and Takashi Yamamura

第34回日本免疫学会総会 横浜。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし