

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15年度～17年度 総合研究報告書

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

- 「 $V\alpha 19 - J\alpha 33$ 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」 ----- 13
三菱化学生命科学研究所 島村 道夫
- $V\alpha 19J\alpha 33T$ 細胞を標的とした治療法開発に関する研究 ----- 20
国立精神・神経センター神経研究所 三宅 幸子
- 身体炎症が脳の炎症レベルに及ぼす影響 ----- 30
東京都精神医学総合研究所 秋山 治彦
- ヒト神経系バリアーを構成する毛細血管内皮細胞の分子細胞学的研究 ----- 35
山口大学医学部脳神経病態学神経内科 神田 隆
- 多発性硬化症における軸索伸長阻害因子 Nogo の役割 ----- 50
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 ----- 59

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 64

I. 総合研究報告

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长

研究要旨

本研究では生体の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。研究の対象は、免疫制御細胞、自己抗体、神経伝達物質などに及ぶが、特に 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において、大きな成果が上がった。このユニークなリンパ球は MS の脳病変に浸潤しているが、同細胞を過剰発現または欠損する遺伝子改変マウスを用いて、MS の動物モデル実験的自己免疫性脳炎（EAE）を制御する重要な機能を有することを証明した。さらに同細胞を介する免疫制御機構として、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。また同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も進み、EAE 抑制効果を有するリガンドを発見した。第二の NKT 細胞は腸内細菌依存性で環境要因の影響を大きく受ける。一連の研究は MS の病態機構解明と治療法開発の観点から、画期的な成果をあげたものと考えられる。神経系を介した免疫制御システムの研究も進み、NPY やカテコラミンを介した炎症制御機構の存在が明らかになった。

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 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、中枢神経系の代表的な脱髄疾患であるが、その本態は中枢神経抗原に対する異常な自己免疫応答であることが明らかになっている。わが国では 30 年前の患者登録数は 500 例に満たなかったが、近年増加傾向が明らかで、既に 10,000 人を突破している。女性患者の比率の上昇も明らかで、過去 30 年間における環境因子（後天的因子）の変化がわが国の MS に大きな

影響を与えているものと考えられる。

MS の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。長期予後改善と言われるインターフェロンベータについても、有効例は 40%程度であり、20-25%の症例が副作用のため継続を断念している。

自己免疫病を惹起しうるリンパ球は健常人の免疫系にも存在するが、本来備わっている制御機構（免疫制御ネットワーク）の働きによって発病は阻止されている。本研究では、健常者の免疫制御機構の詳細を明らかにし、この機構が効果的に働くようにする方法（治療薬）の開発を目的としている。このアプローチの明らかな点は、異常な免疫応答を介在するリンパ球を殺傷する免疫抑制剤とは異なり、正常な免疫制御システムの促進または回復をねらうという点であり、MS のような慢性疾患に対する治療戦略として理にかなっている。

免疫制御系に絡むリンパ球に関する知見は近年増大しているが、本研究ではわが国発のオリジナルな成果をねらい、最近日本とフランスで発見された MR1 拘束性 NKT 細胞（第二の NKT 細胞）を中心的な研究対象として選択した。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、NK 細胞のマーカー分子を発現し、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 CD1d 拘束性 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簇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。しかしヒトの材料を扱う限りにおいて、同細胞の MS 病態に関する役割については推測の域を出なかった。

本研究プロジェクトでは、第二の NKT 細胞が MS の炎症制御に関与するという仮説を立て、それを動物モデル実験的自己免疫性脳炎 (EAE) で検証した。また、同細胞のリガンド探索を通して MS 治療に有用な物質を探索した。また、中枢神経系内の免疫制御システムとしての CA 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

トランスジェニック・マウスの作製：

第二の NKT 細胞の発現する invariant V α 19-J α 33 TCR α 鎖を発現するハイブリドーマからクローニングした 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トランスジーンを作製し、これを受精卵 (B6または TCR- α ⁺) に導入して、それぞれの Tg マウスの系統を樹立した。

EAE 実験：

B6 マウス、第二の NKT 細胞を過剰発現するマウス (V α 19-J α 33 トランスジェニックマウス)、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 μ g 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。

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 V α 19-J α 33 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：

TCR α ノックアウトを背景に持つ V α 19-J α 33 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。

CA 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 の臨床スコア (重症度最大値) は、野生型 B6 マウスに比較して、V α 19-J α 33 トランスジェニックマウスで有意に低く、第二の NKT 細胞の過剰発現が病態に対して抑制的に働くことが示唆された。つぎに、第二の NKT 細胞が機能を発揮するためにはコンベンショナルな CD1d 拘束性 NKT 細胞が必要か否かを検討することにした。具体的には、CD1d ノックアウトマウス (CD1d 拘束性 VNKT 細胞が存在しない) につぎあわせた、V α 19-J α 33 トランスジェニックマウスと CD1d ノックアウトマウスを用いて EAE 誘導実験を行ったが、やはり V α 19-J α 33 TCR の過剰発現により EAE 臨床スコアが低下することがわかった。しかし、両群において罹患率に差はなかった。一方、MR1 ノックアウトマウスにおいては、EAE の症状は有意に悪化した。これらの結果から、V α 19-J α 33 T 細胞が、自己免疫性炎症を抑制する重要な制御細胞であることが示唆された。

EAE 誘導実験に平行して、感作動物の MOG₃₅₋₅₅ 特異的リンパ球の増殖反応およびサイトカイン産生能を評価した。増殖反応については V α 19-J α 33 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ことから、V α 19-J α 33 TCR の過剰発現に伴い MOG 反応性 T 細胞の頻度に変化が生じ、その結果、EAE の重症度が変化した可能性は否定された。

MOG₃₅₋₅₅ に対する抗体測定の結果、V α 19-J α 33

トランスジェニック/CD1d ノックアウトマウスでは、IgG1、IgE アイソタイプの抗 MOG 抗体が有意に高く、MOG 特異的な T 細胞反応が 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 19-J α 33 トランスジェニックマウスでは野生型 B6 マウスと比較して IL-2 の産生低下がみられたが、TNF- α 、IFN- γ 、IL-13 については有意差がなかった。IL-4、IL-5 については検出されなかった。V α 19-J α 33 トランスジェニック/CD1d ノックアウトマウスでは、CD1d ノックアウトマウスと比較して、IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-13、IL-6 の有意な産生低下が見られたが、IL-10 産生は増加していた。IL4、IL-5 については測定感度以下であった。

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、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がわかった。これらの結果から、第二の NKT 細胞を介した免疫制御ネットワークにおける 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 産生がみられなくなることもわかり、ICOS 分子が V α 19-J α 33T 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。

V α 19 トランスジェニック/CD1d ノックアウトマウスの肝単核球は α -galactosylceramide あるいは α -mannosylceramide 刺激で増殖し、IFN- γ

を産生し、これらがリガンド物質候補であることがわかった。 α -galactosylceramide はコンベンショナルな CD1d 拘束性 NKT 細胞を強く刺激するため、V α 19 NKT 細胞を選択的に刺激する実験に使うことは困難であると考え、 α -mannosylceramide の変異体を合成した。EAE の抑制効果を指標に作用を検討したところ、そのうちのひとつ(リガンド1bと命名)がEAEを強く抑制する活性を持つことがわかった。

リガンド1bを投与した群では、MOG₃₅₋₅₅に対するrecall反応では肝単核球、脾細胞、リンパ節細胞いずれにおいてもIFN- γ 産生が著しく低下していた。IL-4産生は肝単核球、脾細胞では低下していたが、リンパ節細胞では、コントロール群と比較して同程度の産生がみられた。

D. 考察

本研究では、第二の NKT 細胞 (V α 19-J α 33 T 細胞) を介した免疫制御機構の解明と、それを標的とした治療法開発を進めた。同細胞は、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、コンベンショナルな CD1d 拘束性 NKT 細胞と類似している点も多いが、生体での機能については報告がない。そこで、V α 19-J α 33T 細胞を過剰発現あるいは欠損する遺伝子改変マウスを確立し、これらのマウスにおける EAE 誘導実験を行うことによって、同細胞が自己免疫性炎症にどのような影響を与えるか、また CD1d 拘束性 NKT 細胞のように治療標的として有望かどうかについて検討した。

V α 19-J α 33 T 細胞はヒトの末梢血には多いが、マウスでは V α 14 NKT 細胞と比較するとその数が少ないことから、まず V α 19-J α 33 トランスジェニックマウスを用いて実験を行うこととした。

V α 14 NKT 細胞の影響を除くために、V α 19-J α 33 トランスジェニックマウスを CD1d ノックアウトマウスに交配したマウスも実験に利用した。EAE 誘導実験の結果、野生型マウスでも CD1d ノックアウトマウスにおいても、V α 19-J α 33 TCR の過剰発現により、EAE の臨床症状は強く抑制されることがわかった。その抑制機序を検討するために、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 19-J 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 19-J α 33 トランスジェニック/CD1d 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、これは主に B 細胞から産生されると考えられた。

現時点では、V α 19-J α 33T 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 が第二の NKT 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 MR1 ノックアウトマウスを用いて、これらの糖脂質が V α 19-J α 33T 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 19-J 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

第二の NKT 細胞 (V α 19J α 33 T 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 MS の動物モデルである 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。また、V α 19-J α 33 T 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. 研究発表

I 論文発表

原著

1. Koike F, Satoh J-i, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T and Yamamura T. Microarray analysis identifies interferon b- regulated genes in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 139(1-2): 109-118, 2003
2. Bedoui S, Miyake S, Lin Y, Miyamoto K, Oki S, Kawamura N, Beck-Sicking A, von Horsten S and Yamamura T. Neuropeptide Y (NPY) suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: NPY₁ receptor-specific inhibition of autoreactive Th1 responses in vivo. *J. Immunol.* 171(7): 3451-3458, 2003
3. Nakamura T, Sonoda K-H, Faunce DE, Gumperz J, Yamamura T, Miyake S and Stein-Streilein J. CD4+ NKT cells, but not conventional CD43+ T cells, are required to generate efferent CD8+ T regulatory cells following antigen inoculation in an immune-privileged site. *J. Immunol.* 171(3): 1266-1271, 2003

4. Stanic AK, Shashidharamurthy R, Bezbradica JS, Matsuki N, Yoshimura Y, Miyake S, Choi EY, Schell TD, Van Kaer L, Tevethia SS, Roopenian DC, Yamamura T and Joyce S. Another view of T cell antigen recognition: cooperative engagement of glycolipid antigens by Va14Ja18 natural TCR. **J. Immunol.** 171(9): 4539-4551, 2003
5. Oki S, Asako C, Mizuno M, Tomi C, Yamamura T and Miyake S. Duration of antigenic stimulation and transcriptional activation determine differential cytokine production by natural killer T (NKT) cells. Under revision for publication in **J. Clin. Invest.** 113(11): 1631-40, 2004
6. Satoh J, Yamamura T, Arima K: The 14-3-3 protein epsilon isoform expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple sclerosis binds to vimentin and glial fibrillary acidic protein in cultured human astrocytes. *American Journal of Pathology* 165(2): 577-592, 2004.
7. 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
8. Illes Z., Shimamura M., Newcombe, J., Oka, N. and Yamamura T, Accumulation of Va7.2-Ja33 invariant T cells in human autoimmune inflammatory lesions in the nervous system. *Int. Immunol.*, 16(2): 223-230 (2003)
9. 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
10. 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
11. 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
12. 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.** 18(3):537-50, 2005
13. 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 inducing Th2 polarization of donor T cells. **J. Immunol.** 174:551-556, 2005
14. 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
15. 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

16. 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
17. 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
18. 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
19. 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
20. 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
21. 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
22. 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
23. 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)
24. 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: 129-138, 2005

総説

英文

1. Yamamura T, Miyamoto K, Illes Z, Pal E, Araki M, and Miyake S. Synthetic glycolipids as potential therapeutics for autoimmune disease. *Curr.Topics.Medic.Chem.* 4(5): 561-7, 2004
2. Miyake S, Chiba A and Yamamura T. Potential of targeting natural killer T cells for the treatment of autoimmune diseases. *Mod.Rheum.* 14: 279-84, 2004
3. Bedoui S, Miyake S and Yamamura T. More sympathy for autoimmunity with neuropeptide Y? *Trends Immunol.* 25(10): 508-12, 2004.

4. 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
 5. Croxford, J.L. and T. Yamamura: Cannabinoids and the immune system: Potential for the treatment of inflammatory diseases? **J. Neuroimmunol.** 166: 3-18, 2005
- 邦文
1. 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
 2. 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
 3. 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- 日本臨床 Suppl 5: 422-426, 2005
 4. 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
 5. 山村 隆 : 多発性硬化症と NK 細胞. **Current Insights in Neurological Science** 13(3): 10-11, 2005
 6. 山村 隆 : ニューロペプチド Y と免疫制御. **臨床免疫** 44(3): 324-327, 2005
 7. 山村 隆 : 糖脂質による新しい治療. **臨床神経** 45:909-911, 2005
 8. 三宅幸子, 千葉麻子 : NKT 細胞合成糖脂質リガンドによる関節炎の治療 **臨床免疫** 40(1): 61-65, 2003
 9. 三宅幸子 : 神経ペプチドと自己免疫疾患 **Brain Medical** 15(4): 27-32, 2003
 10. 山村 隆 : NKT 細胞と自己免疫 : 調整性 CD4⁺NKT 細胞の役割 **Mol. Med.** 40(5):562-568, 2003
 11. 山村 隆, 林 幼偉, 三宅幸子 : 多発性硬化症の進行を抑制する免疫細胞 **Brain Medical** 15(4)55-59, 2003
 12. 三宅幸子 : NKT 細胞と自己免疫疾患 **内科** 93(2): 213-216, 2004
 13. 三宅幸子 : 免疫制御細胞と自己免疫疾患 **Mol. Med.** 41(2):177-182, 2004
 14. 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
 15. 三宅幸子 : 自己免疫性脳脊髄疾患の糖脂質療法 **Annual Review 免疫 2004** 柳澤信夫、篠原幸人、岩田誠、清水輝夫、寺本明編、中外医学社、東京 237-244, 2004
 16. 三宅幸子 : 免疫制御細胞と自己免疫疾患 **Mol. Med.** 41(2):177-182, 2004
 17. 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

18. 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
19. 三宅幸子: Cb1 ファミリーと自己免疫 **分子リウマチ** 1(3):16-22, 2004
20. 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(3): 375-8, 2004
21. 三宅幸子: 自己免疫疾患と細胞性免疫 **MEDICO** 35(10):9-11, 2004
22. 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
23. 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
24. 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
25. 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):546-551, 2004
26. 三宅幸子: α -ガラクトシルセラミドとその誘導體 **分子リウマチ** 2(1): 39-46, 2005
27. 三宅幸子: 免疫調節細胞と自己免疫疾患 **Mol. Med.** 42(4): 385-91, 2005
28. 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
29. 三宅幸子: OCH と CD 1D **炎症と免疫** 13(4): 134-6, 2005
30. 三宅幸子: 多発性硬化症 **最新医学** 60(6): 183-92, 2005
31. 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
32. 秋山晴彦: 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

II 学会発表

国際学会

- 1) Chiba A, Oki S, Miyamoto K, Yamamura T and Miyake S. A synthetic glycolipid OCH prevents Th1-mediated autoimmune diseases by inducing Th2 bias of natural killer T (NKT) cells. FOCIS (Federation of Clinical Immunology Societies) 3rd annual Meeting, Paris, France, May 17, 2003. (Clinical Immunology, 104:S122, 2003)
- 2) Oki S, Chiba A, Yamamura T and Miyake S. The molecular basis of preferential IL-4 production by murine natural killer T cells stimulated with altered glycolipid ligand
- 3) 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

- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) Chiba A, Kaieda S, Oki S, Yamamura T, Miyake S. The critical role of NKT cells in the 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)
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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)

国内学会

- 1) 荒木学、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ーヒト NKT 細胞クローンによる解析、第 15 回日本神経免疫学会、2003 年 12 月 4 日、長崎
- 2) 林幼偉、宮本勝一、三宅幸子、橋本修治、山村隆：P0 (+/-) ヘテロミュータントマウスと類似のヒトの遺伝子疾患の検討、第 15 回日本神経免疫学会、2003 年 12 月 4 日、長崎
- 3) 千葉麻子、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 47 回日本リウマチ学会、2003 年 4 月 24 日、東京
- 4) 千葉麻子、阿部香織、山中健次郎、山村隆、橋本博史、三宅幸子：T 細胞受容体刺激により、チロシンリン酸化ならびにアポトーシスが著明に亢進する SLE 患者リンパ球の解析、第 47 回日本リウマチ学会総会、2003 年 4 月 24 日、東京

- 5) 大木伸司、千葉麻子、山村隆、三宅幸子：OCH 刺激 NKT 細胞による選択的な IL-4 産生の分子機構の解析、第 33 回日本免疫学会、2003 年 12 月 9 日、福岡
- 6) 荒木学、三宅幸子、山村隆：合成糖脂質 OCH リガンドによるヒト細胞 Th2 偏倚（ヒト NKT 細胞クローンによる解析）、第 33 回日本免疫学会、2003 年 12 月 9 日、福岡
- 7) 千葉麻子、橋本博史、山村隆、三宅幸子：T 細胞受容体刺激により、アポトーシスならびにチロシンリン酸化が著明に亢進する SLE 患者リンパ球の解析、第 33 回日本免疫学会、2003 年 12 月 9 日、福岡
- 8) 林幼偉、ベドウィーサミー、三宅幸子、山村隆：Neuropeptide Y による実験的自己免疫性脳せき髄炎 (EAE) の制御、第 33 回日本免疫学会、2003 年 12 月 9 日、福岡
- 9) 中井之人、岩渕和也、藤井聡、石森直樹、綿野敬子、三島鉄也、中山俊憲、谷口克、Van Kaer Luc、三宅幸子、山村隆、小野江和則：変性脂質負荷によるマクロファージの CD1d 発現増強、第 33 回日本免疫学会、2003 年 12 月 9 日、福岡
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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

20) 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

21) 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

22) 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

23) 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

24) 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

25) 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

26) 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

27) 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

28) 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

G. 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

II. 分担研究報告

「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) の免疫系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、V α 19 NKT 細胞の基本性質の明確化を目指した。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) マウスを作成し、NKT 細胞の臓器分布を調べた結果、NKT 細胞は肝臓に多く存在し、骨髄、脾臓、リンパ節、腸管粘膜固有層にも少数見られた。V α 19NKT 細胞の TCR 刺激後のサイトカイン分泌能は刺激初期には Th2 推進サイトカイン (IL-4, IL-5, IL-10) の分泌が優位で、継続刺激により Th1 サイトカイン (IFN- γ , IL-12) が優勢となった。この時さらに V α 19 NKT 細胞の活性化を引き金としてこれの分泌する液性因子によりエフェクター T 細胞にシグナルが伝達され炎症増進性サイトカイン IL-17 の分泌が誘導された。V α 19 NKT 細胞は MHC クラス Ib 分子、MR1 により拘束され、これに提示された親水部に α -mannosyl 基を有するある種の糖脂質を特異抗原として認識して活性化することがわかった。そのひとつ α -ManCer のセラミド部位の構造を変換した一連の化合物中に、V α 19 NKT 細胞の Th1 あるいは Th2 サイトカインを優先的に分泌誘導する物質が見出され、症状に合わせた自己免疫性神経疾患の治療への応用が期待される。V α 19 TCR Tg マウスでは Th1 あるいは Th2 過剰アレルギーモデルにおいて症状の抑制が認められ、V α 19 NKT 細胞による免疫系制御により自己免疫が抑制されることが示唆された。

A. 研究目的

Invariant V α 19-J α 33 TCR α 鎖発現新規 V α 19 NKT 細胞は TCR への刺激に応答して免疫系制御に重要なサイトカイン IL-4、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。一方で多発性硬化症の患部への V α 19 NKT 細胞

の集積が示唆された。そこで V α 19 NKT 細胞の特異抗原を使って免疫系制御を可能とし、それに基づいた難治性の自己免疫性神経疾患の新規な治療法の開発を目的とした。

B. 研究方法

Invariant $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ TCR α 鎖を発現するハイブリドーマからクローニングした 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トランスジーンを作成し、これをマウス受精卵 (C57BL/6, および TCR α -/-) に導入してそれぞれの Tg マウスの系統を樹立した。CD1-/-バックグラウンドの Tg マウスは C57BL/6 バックグラウンドの Tg マウスと CD1-/-マウスの交配から得た。

Tg マウスにおける NKT 細胞の臓器分布は臓器の細胞浮遊液から単核球を密度勾配遠心法で調製し、抗 NK1.1 および抗 TCR $\alpha\beta$ 抗体による免疫染色後、フローサイトメトリーにより分析して明らかにした。

生体内刺激に応答した $V\alpha 19$ NKT 細胞のサイトカイン分泌は Tg マウスに抗 CD3 抗体 (2C11) 投与後の血清および脾臓の培養上清の ELISA 法分析により調べた。培養中での刺激に応答した $V\alpha 19$ NKT 細胞のサイトカイン分泌は固相化抗 CD3 抗体上での Tg マウス細胞の培養上清の分析により調べた。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フローサイトメーターで分析することにより行った。

$V\alpha 19$ NKT 細胞の微細形態は透過型電子顕微鏡観察により行った。観察には JEM 1230 EX (日本電子) を使用した。

MR 1 遺伝子導入細胞は C57BL/6 マウス脾臓細胞よりクローニングした cDNA (MR1A) を

大阪大学 宮崎純一博士より供与された哺乳細胞発現ベクター pCXN2 に組み込み、これをマウスメラノーマ株 B16 の垂株 (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)、あるいはヒトバーキット 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 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。

抗原の活性測定は肝臓リンパ球をリスボンダーとし、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おこなった。 α -ManCer 誘導体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。2, 6-di α -mannosyl phosphatidylinositol (Man(Man)PI), α -mannosyl-4- β -glucosaminyl-6-phosphatidylinositol (Man-GlcNH₂-PI) はそれぞれ愛媛大学 渡辺裕博士、理化学研究所 小川智也博士より供与を受けた。

ヤギ抗マウス IgD 抗血清 (Cincinnati 大学 F. Finkelman 博士より供与) 投与前後の血清イムノグロブリンレベルは ELISA 法により定量した。遅延型過敏症はマウスをヒツジ赤血球で感作 1 週間後足蹠皮下にヒツジ赤血球を再投与し、足蹠の腫脹を測定することで評価した。

(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。

C. 研究結果

1. Invariant $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ TCR α 発現 NKT 細胞の発生、組織分布

Invariant $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ TCR α 鎖トランスジーンを TCR α -/- マウス受精卵に導入して作成した Tg マウスにおける NKT 細胞の臓器分布を調べた結果、NKT 細胞は肝臓に多く存在し(単核球の約 30%)、骨髄、脾臓、リンパ節、胸腺、腸管粘膜固有層リンパ球(LPL)中にも少数見られた。TCR α 鎖使用の自由度のある CD1-/-バックグラウンドの Tg マウスでの NKT 細胞、T 細胞におけるトランスジーンの使用頻度はいずれの臓器でも NKT 細胞で高くなっており、invariant $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ TCR α 鎖発現前駆細胞は NKT 細胞に優先的に分化しやすいことがわかった。

2. $V\alpha 19$ NKT 細胞の形態

TCR α -/-バックグラウンドの Tg マウスから調製した NKT 細胞の電子顕微鏡観察により明らかになった $V\alpha 19$ NKT 細胞の形態は $V\alpha 14$ NKT 細胞に類似し、T、NK 細胞の中間の細胞および核の大きさを持ち、狭い細胞質にはごく少数のミトコンドリアと小顆粒が観察されるのみで、NK 細胞で多く存在する顆粒には富んでいなかった。

3. $V\alpha 19$ NKT 細胞のサイトカイン分泌

$V\alpha 19$ NKT 細胞の *in vivo* における

invariant TCR への刺激後のサイトカイン分泌能を調べた。抗 CD3 抗体投与 Tg マウス血清、および脾臓細胞の培養上清には 1~2 時間をピークとした即時的な Th2 推進サイトカイン (IL-4, IL-5, IL-10) の分泌が優位に観察された。Th1 サイトカイン (IFN- γ , IL-12) もややおくれて刺激 2 時間後をピークとして分泌され、IFN- γ は 24 時間後まで分泌が持続した。この時さらに炎症反応を進めるのに重要なサイトカイン IL-17 の分泌が 24 時間をピークとして昂進されていた。Tg マウス細胞を *in vitro* で TCR への刺激を与えたときのサイトカイン分泌も同様のパターンを示した。Tg マウス肝臓単核球を固相化抗 CD3 抗体上で培養して TCR への刺激を入れる方法ではサイトカイン分泌は *in vivo* 感作に比べ遅れるが、IL-4 は培養 1 日後、IFN- γ , IL-17 は培養 3 日後をピークとして産生された。ここでこのような特徴的なサイトカインの分泌が Tg マウス $V\alpha 19$ NKT 細胞の活性化に起因した現象であることは Tg マウス肝臓単核球から NKT 細胞を精製してリスポンダーとして用いても同様の結果が得られたことから明らかになった。逆に肝臓単核球から NK1.1+細胞を除去すると IFN- γ は除去前と同様に産生されたが IL-4, IL-17 の分泌がほとんど見られなくなった。また後述の抗原糖脂質の刺激を与えて $V\alpha 19$ NKT 細胞を特異的に活性化したときにも同様のサイトカイン分泌パターンが得られた。対照として行った $\beta 2m$ -/-マウス肝臓単核球についての実験では IL-4, IL-17 の分泌はほとん

ど観察されず、一方 B6 マウス細胞では IL-4 の分泌は $V\alpha 14$ NKT 細胞の寄与により起こったが、IL-17 産生は Tg マウス細胞の 1/2 以下だった。これらの結果も Tg マウス細胞に見られる特徴的サイトカイン分泌は $V\alpha 19$ NKT 細胞の活性化に起因して誘導されることを強く示唆している。

細胞内 IL-17 染色実験の結果、抗 CD3 抗体刺激 3 日後の $V\alpha 19$ Tg 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してシグナルが 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 T 細胞であることが示唆された。 $V\alpha 19$ 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、別に調製した $V\alpha 19$ Tg, B6, および $\beta 2m^{-/-}$ マウス脾臓細胞におのおのを加え、抗 CD3 抗体の刺激はなしで 2 日間培養し、培養上清への IL-17 分泌を分析した。その結果活性化 $V\alpha 19$ 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、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。ここで培養上清中に IL-23 は検出されなかった。

4. $V\alpha 19$ NKT 細胞の抗原

以上の観察から予測される新規 $V\alpha 19$ NKT 細胞の免疫系調節機能を生かした疾患治療法を開発するために、この細胞の特異

的なリガンドの検索をおこなった。 $V\alpha 19$ NKT 細胞は LPL の構成細胞として見出された MAIT 細胞同様 MHC クラス Ib 分子、MR1 により拘束されていることを MR1 遺伝子導入細胞を使った刺激実験から確かめた。

つぎに MR1 に提示される $V\alpha 19$ NKT 細胞の抗原を決定するために種々の化合物を候補として Tg マウス肝臓単核球細胞培養に添加してそれらの $V\alpha 19$ NKT 細胞刺激能を調べた。その結果 α -ManCer, Man(Man)PI, および Man-GlcNH₂-PI が活性物質として見出された。これらはいずれも親水部に α -マンノシル基を有する両親媒性物質であるという共通点があった。MR1 遺伝子導入細胞に取り込ませると $V\alpha 19$ NKT 細胞を効率よく刺激した。ここでレスポンドーとして使用する Tg マウス肝臓細胞を NK1.1+ と NK1.1- に分画すると α -マンノシル化糖脂質に対する応答性は NK1.1+ 画分に存在し、これより $V\alpha 19$ NKT 細胞が糖脂質と反応することが確かめられた。Tg マウスの肝臓のみならず脾臓や腸管リンパ球もこれらの糖脂質に対して免疫応答した。

抗原活性を持つ α -マンノシル化糖脂質のうち α -ManCer に注目し、これのセラミド部位の構造を変換して MR1 抗原提示溝との相互作用を変化させ、結果として invariant TCR によるこの糖脂質の認識に変化を与えた。 α -ManCer セラミド部位の 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 $V\alpha 19$ Tg 細胞に対する免疫応答誘導を比較した結果、2HM 導入 α -ManCer は IL-4 の分泌