

誘導を増強し、4Ph 導入 α -ManCer では IL-4, IFN- γ 両者の分泌を増強し、一方 2HM、4Ph 両方を導入した α -ManCer は IFN- γ の分泌を優先的に誘導することがわかった。これらはいずれも無修飾の α -ManCer よりも大きな抗原活性があった。

V α 19 NKT 細胞は前述のごとく MR1 遺伝子導入細胞からこれにあらかじめ外来抗原を取り込ませたときよりは減弱するものの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についての知見を基に内在抗原の絞り込みを目指した。V α 19 NKT 細胞に対して、 β -GlcCer synthase あるいは GPI アンカー合成関連酵素 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。V α 19Tg マウス肝臓リンパ球をリスポンダーとしたときの MR1 遺伝子導入メラノーマ株 (MR1-MEB4) とその β -GlcCer synthase 欠損 MR1 遺伝子導入細胞株 (MR1-GM95) の刺激能はほぼ拮抗した。一方 PIG-L 欠損 MR1 遺伝子導入細胞 MR1-Raji26 の刺激能も野生型 MR1 遺伝子導入細胞 MR1-Raji に遜色なかった。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。

5. V α 19 NKT 細胞の自己免疫抑制

V α 19 TCR Tg マウス血清イムノグロブリンレベルは non-Tg マウスと比較して Th2 優位の環境下で産生増強されるアイソタイプ、特に IgE のレベルが高まっていた。このことから生体内で V α 19 NKT 細胞は Th1/Th2 ホメオスタシスに関与し、免疫系調節機能を持つことが示唆された。

V α 19 Tg マウスにポリクローナルな免疫系賦活作用のあるヤギ抗マウス IgD 抗血清を投与したところ、Th2 アイソタイプ IgE, IgG1 の血清レベルの上昇は正常マウスに比べ抑制され、Th1 アイソタイプ IgG2a では両マウスに有意の差がなかった。

一方、細胞免疫性の IV 型アレルギーに分類される遅延型過敏症モデルでは V α 19 Tg マウスでは病状が正常マウスに比べ抑制されていた。以上より V α 19 NKT 細胞は Th1 および Th2 過剰のいずれのモデルにおいても Th1/Th2 ホメオスタシスに関与し、免疫系調節機能を持つことが示唆された。

D. 考察

Invariant V α 19-J α 33 TCR α 遺伝子の発現に依存して V α 19 NKT 細胞が発生することが明確になった。Tg マウスでは V α 14 NKT 細胞同様に肝臓、骨髄における存在数の多いことがわかった。また腸管粘膜固有層でも有意の増加が認められた。この細胞の正常マウスでの臓器分布を明らかにするため invariant TCR のリガンド MR1 のテト

ラマーの調製を試みた。セラミド4位に Ph 基を導入した α -ManCer を取り込ませたとき MR1 テトラマーにより見かけ上 Tg マウス NKT 細胞の一部だけが染色されることがフローサイトメトリーで明らかになった。これは抗原の適合性が不十分で染色性が弱いいためなのか Tg マウスに発生する NKT 細胞が TCR β 鎖の不均一性などに起因して特異性が多様なためかなど問題点を明らかにし、 $V\alpha 19$ NKT 細胞の組織分布を調べていきたい。

$V\alpha 19$ NKT 細胞は invariant TCR への刺激に応答して即時的に Th2 サイトカインを、遅れて Th1 サイトカインを分泌した。これは $V\alpha 14$ NKT 細胞と共通の性質であったが、加えて $V\alpha 19$ NKT 細胞は継続刺激により共存する T 細胞による IL-17 の分泌を増加させる特徴があった。対照として調べた B6 マウス NKT 細胞では IL-17 の分泌は小さく両 NKT 細胞の相違が示唆された。IL-17 は IL-23 とともに ICOS および CD28 への刺激により分化誘導されるヘルパー-T 細胞による産生が報告されている。今回の検討から、 $V\alpha 19$ NKT 細胞の抗原刺激を起源としてこれの分泌する液性因子のシグナルを介して実質的なエフェクター細胞である T 細胞が活性化される新しい経路が示唆された。 $V\alpha 19$ NKT 細胞の炎症促進性サイトカイン IL-17 の分泌増強作用が免疫系制御とどのように関わるのか、分泌の局在、タイミングや条件によるサイトカイン分泌パターンの変化等を考慮し、 $V\alpha 19$ NKT 細胞を多面的にとらえる必要がある。

$V\alpha 19$, $V\alpha 14$ TCR Tg マウスでの血清イムノグロブリンアイソタイプからは $V\alpha 19$, $V\alpha 14$ 両 NKT サブセットとも平常時免疫系の Th2 シフトへの寄与が予測された。しかし液性、細胞性免疫過剰のアレルギー (I 型, IV 型) モデルでは $V\alpha 19$ NKT 細胞はいずれの場合も Th1/Th2 ホメオスタシスに寄与し、症状の緩和に機能することが示唆された。

今後 $V\alpha 19$ NKT 細胞の機能について見出されてきた諸知見は現在得られているターゲットイングベクターの相同組み替えが起こった ES 細胞から作成を目指している $V\alpha 19$ NKT 細胞欠損マウスを活用し確かめていく予定である。

E. 結論

$V\alpha 19$ NKT 細胞は $V\alpha 14$ NKT 細胞同様特徴的なサイトカイン分泌能を有し免疫系調節に重要な機能を果たしていることが予測された。しかし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 IL-17 分泌誘導に見られたように異なる機能を持ち巧妙に免疫系の調節にあたっていることが示唆された。本研究で見出された α -ManCer 類似体により $V\alpha 19$ NKT 細胞に特異的にその免疫調節機能を制御とすることが可能となった。自己免疫性神経疾患の治療を念頭に置いて疾患モデル動物への作用の検討が望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Naoki Okamoto, Osamu Kanie, Yi-Ying Huang, Rei Fujii, Hiroko Watanabe, and Michio Shimamura Synthetic α -mannosyl ceramide as a potent stimulant for an NKT cell repertoire bearing the invariant $V\alpha 19$ - $J\alpha 26$ TCR α chain. *Chem. & Biol.* 12: 677-683, (2005)

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

Induction of promotive rather than suppressive immune responses from a novel NKT cell repertoire $V\alpha 19$ NKT cell with α -mannosyl ceramide analogues consisting of the immunosuppressant ISP-I as the sphingosine unit. *Eur. J. Med. Chem. (in press)*

3. Shimamura, M., Kobayashi, K., Watanabe, H., Huang, Y.-Y., Okamoto, N., Kanie, O., Goji, H., and Kobayashi, M. Generation of $V\alpha 14$ NKT cells in vitro from hematopoietic precursors residing in bone marrow and peripheral blood. *Eur. J. Immunol.* 34: 735-742(2004)

4. Illes, Z., Shimamura, M., Newcombe, J., Oka, N. and Yamamura, Accumulation of $V\alpha 7.2$ - $J\alpha 33$ invariant T cells in human autoimmune inflammatory lesions in the nervous system. *Int. Immunol.*, 16(2): 223-230 (2003)

5. Shimamura, M., Huang, Y.-Y., and Goji, H. Antibody production in early life supported by maternal lymphocyte factors. *Biochim. Biophys.*

Acta, Molecular Basis of Disease, 1637: 55-58(2003)

2. 学会発表

1. 島村道夫, 新規 $V\alpha 19$ NKT 細胞の抗原認識 第34回日本免疫学会総会 横浜。

2. Ludovic Croxford, Sachiko Miyake, Michio Shimamura, and Takashi Yamamura, $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ invariant NKT cells regulate experimental autoimmune encephalomyelitis.

第34回日本免疫学会総会 横浜。

3. 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 $V\alpha 14$ NKT 細胞ならびに $V\alpha 19$ NKT 細胞の機能解析

第33回日本免疫学会総会 札幌

4. J. Ludovic Croxford, Sachiko Miyake, Michio Shimamura and Takashi Yamamura, Over-expression of $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ 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

5. 島村道夫, 小林麻須美、岡本直樹、五字弘、黄怡瑩、渡邊寛子、藤井玲、新規 $V\alpha 19$ NKT 細胞の機能解析、第32回日本免疫学会総会

G. 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 |

厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
（総合）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、活性化マーカーを持ち、炎症病変に集積してサイトカインを産生するユニークなリンパ球である。V α 19J α 33T 細胞は MHC クラス Ib に属する MR1 分子に結合した抗原を認識することが想定されているが、その生理機能は不明である。そこで、V α 19J α 33T 細胞受容体の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、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) における V α 19J α 33T 細胞の役割について検討した。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、EAE の重症度がコントロール群に比較して有意に軽症であり、MR-1 ノックアウトマウスでは EAE が重症化した。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た。また、V α 19J α 33T 細胞を刺激することによって、EAE を抑制する糖脂質について探索し、合成糖脂質の一部に EAE 抑制効果のあるものを発見した。

A. 研究目的

これまで我々は、V α 14NKT 細胞を刺激して、Th2 サイトカインを選択的に産生させる糖脂質 OCH を合成し、OCH が EAE を抑制することを示し、免疫制御細胞が多発性硬化症等の免疫性疾患の治療の標的になることを明らかにしてきた。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。また、V α 19J α 33T 細胞を刺激し増殖反応・サイトカイン産生がみられる合成糖脂質の中で、EAE の治療効果のあるもののスクリーニングしたので報告する。

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 Myelin Oligodendryocyte Glycoprotein(MOG)由来のペプチド MOG₃₅₋₅₅ をフロイト完全アジュバントとともに免疫して EAE を誘導し、臨床症状を比較した。臨床スコアは以下のとおりとした。0：正常、1：尾のトーヌスの低下、2：尾の完全下垂、3：歩行異常、4：後肢完全脱力、5：前肢脱力を含む後肢完全脱力、6：死亡。MOG₃₅₋₅₅ に対するリンパ球の反応性は、MOG₃₅₋₅₅ 感作後 10-14 日目のマウスのリンパ節細胞を摘出し、MOG₃₅₋₅₅ による再刺激を行い、増殖反応ならびに培養上清中のサイトカイン濃度を、ELISA 法もしくは Cytometric Beads Array (CBA)を用いて測定した。MOG₃₅₋₅₅ に対する抗体のアイソタイプは、ELISA 法を用いて測定した。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

EAE の臨床スコアは、野生型 B6 マウスに比較して、V α 19J α 33 トランスジェニックマウスでは、最大値(重症度)が有意に低かった。また、CD1 ノックアウトマウス(CD1 拘束性 V α 14NKT 細胞が存在しない)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 の臨床スコアの最大値は有意に低かった。いずれいれも、罹患率に差はなかった。MOG₃₅₋₅₅ 特異的リンパ球の増殖反応は、V α 19J 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、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。また、MR-1 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、MOG 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。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 19J α 33 トランスジェニック/CD1 ノックアウトマウスでは、CD1 ノックアウトマウスに比較して MOG₃₅₋₅₅ 特異的リンパ球の増殖反応に差はみられなかった。サイトカインでは、IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-13、IL-6 について 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コントロールに比較して有意に産生低下がみられた。IL-10 は、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。IL4、IL-5 については測定感度以下であった。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。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。

V α 19 トランスジェニック/CD1 ノックアウトマウスの肝単核球は α -galactosylceramide、 α -mannosylceramide 刺激で増殖し、IFN- γ を産生

する。 α -galactosylceramide は $V\alpha 14NKT$ 細胞を強く刺激するため、 $V\alpha 19 NKT$ 細胞を選択的に刺激する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 とする) が EAE を強く抑制した。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 $IFN-\gamma$ 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

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

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、 $V\alpha 19J\alpha 33T$ 細胞は、抗原特異的 T 細胞の Th1/Th2 分化に影響を与えたと考えられた。また、 $V\alpha 19J\alpha 33$ 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。現時点では、 $V\alpha 19J\alpha 33T$ 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 $V\alpha 19J\alpha 33T$ 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 $V\alpha 19J\alpha 33T$ 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、 $V\alpha 19J\alpha 33T$ 細胞を特異的に検出できる抗体などが得られていないため、生体内での解析が困難であることから、研究の促進には抗体等の作製が急務である。

E. 結論

$V\alpha 19J\alpha 33T$ 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。また、 $V\alpha 19J\alpha 33$ 細胞を特異的に刺激し、EAE を抑制する抗原の探索は、自己免疫疾患の新しい治療戦略につながる研究として期待できる

F. 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 β -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-Sickingher 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.) 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 α -Galactosylceramide **Arthritis Rheum.** 50(1): 305-313, 2004
- 6.) 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
- 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.) 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
- 9.) 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
- 10.) 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

- 11.) 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
- 12.) 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
- 13.) 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
- 14.) 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
- 15.) 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 alpha-galactosylceramides. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 102(9): 3383-8, 2005
- 16.) 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-g-mediated negative feedback regulation of NKT-cell function by CD94/NKG2. *Blood*, 106(1): 184-92, 2005
- 17.) Chiba A, Kaieda S, Oki S, Yamamura T and Miyake S. The involvement of Va14 NKT cells in the pathogenesis of arthritis in murine models. *Arthritis Rheum.* 52(6):1941-8, 2005
- 18.) Toba T, Murata K, Yamamura T, Miyake S and Annoura H. A concise synthesis of (3S,4S,5R)-1-(alpha-D-galactopyranosyl)-3-tetracosanoylamino-4,5-decanediol, a C-glycoside analogue of immunomodulating alpha-galactosylceramide OCH. *Tetrahedron Letters* 46: 5043-7, 2005
- 19.) 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
- 20.) 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
- 邦文
1. 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
 2. 三宅幸子：神経ペプチドと自己免疫疾患 **Brain Medical** 15(4): 27-32, 2003
 3. 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
 4. 三宅幸子：NKT 細胞と自己免疫疾患 **内科** 93(2): 213-216, 2004
 5. 三宅幸子：免疫制御細胞と自己免疫疾患 **Mol. Med.** 41(2):177-182, 2004
 6. 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
 7. 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
 8. 三宅幸子：免疫制御細胞と自己免疫疾患 **Mol. Med.** 41(2):177-182, 2004
 9. 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
 10. 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
 11. 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
 12. 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
 13. 三宅幸子：自己免疫疾患と細胞性免疫 **MEDICO** 35(10):9-11, 2004
 14. 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
 15. 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
 16. 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
 17. 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

18. 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
19. 三宅幸子 : 免疫調節細胞と自己免疫疾患 **Mol. Med.** 42(4): 385-91, 2005
20. 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
21. 三宅幸子 : OCH と CD1D **炎症と免疫** 13(4): 134-6, 2005
22. 三宅幸子 : 多発性硬化症 **最新医学** 60(6): 183-92, 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)
- 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 Th 2 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

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—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
- 8) 林幼偉、ベドゥーサミー、三宅幸子、山村隆：Neuropeptide Y による実験的自己免疫脳せき髄炎 (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 CD 1d 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 |

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総合研究報告書

身体炎症が脳の炎症レベルに及ぼす影響

分担研究者 秋山治彦 東京都精神医学総合研究所 参事研究員

研究要旨 ヒト剖検脳において、死戦期の強い全身炎症、および脳実質病変の両方が、脳血管内皮細胞や血管周囲細胞を活性化させることを示した。神経変性疾患等による脳病変を有する患者では、比較的軽い身体炎症によっても脳の炎症が強まり、脳機能障害や神経細胞死を増悪させる可能性がある。またラット線状体のドーパミン(DA)系脱入力モデルにおいて、全身炎症に伴う線状体の c-Fos 発現やミクログリア活性化が亢進した。DA 系神経支配は免疫・炎症反応を抑制する機能も併せて担っており、その機能低下は、炎症性神経疾患の増悪や身体炎症の脳実質への波及の促進を招くと思われる。

A. 研究目的

近年、神経変性疾患や脳血管障害を含む多数の神経疾患の病理プロセスに炎症反応が重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。従来、脳は血液脳関門によって末梢の免疫系から隔離され、炎症反応が生じにくい特権的な部位であると考えられていた。しかし実際には、脳自体が自然免疫系に属する様々な要素を有しており、また同時に、脳実質と血液との間には血液脳関門を介した多様な情報伝達や物質の移動があって、それらが動的に制御されている。脳では確かに免疫・炎症反応は起こりにくいですが、それは従来考えられていた“末梢の免疫系からの隔離”よりも、むしろ脳の細胞が自然免疫系を抑制する因子を発現して抗免疫・抗炎症性の微小環境を維持していることによる。本研究は、様々な脳病変において生じている炎症反応と全身炎症との関係、脳の免疫抑制性機構と脳病変の炎症反応との関係に着目し、剖検脳標本およびラットモデル脳病変の解析を通じて、従来全く注目されていなかった視点からの神経疾患治療法の提案を行うことを目的としている。

B. 研究方法

ヒト剖検脳組織標本は、剖検に際して脳の様々な部位を小ブロックとして切り出し、短時間パラホルムアルデヒド固

定を行った後、凍結マイクロームで 30 μ 厚の浮遊切片を作製した。切片は目的とする抗原に対する一次抗体に反応させた後、ABC 法により免疫組織化学染色を行った。

モデル脳病変の解析にはラットを使用した。全身炎症モデルとして LPS の腹腔内投与、髄膜炎モデルとして LPS の大槽内投与、またカテコラミン(CA)系の破壊には内側前脳束への 6-hydroxydopamine (OHDA) 注入を用いた。免疫組織化学染色は、ヒト剖検脳標本の場合と同様に行った。

(倫理面への配慮)

ヒト剖検脳の解析にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理基準に準じて研究を実施した。剖検脳の使用は遺族の承諾を得ることを原則とし、倫理指針策定以前に剖検になった症例については、連結不可能匿名化による個人情報の保護を図った。詳細な研究計画について所属研究所における倫理委員会の承認を受けた。また動物実験は、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」ならびに本研究者所属研究所の動物実験倫理委員会の定めるところに従い、同委員会において具体的な実験計画の承認を受けて実施した。必要最少数の動物を用い、手術に際しては麻酔を用いて苦痛を与えないようにし、また脳摘出に際しては深麻

酔による屠殺をするなどの配慮を行った。

C. 研究結果

ヒト剖検脳組織標本において血管内残存血漿中の CRP を免疫組織化学的に染色することで死戦期の全身炎症の程度をおおまかに推測した上で、全身炎症による脳血管内皮細胞および血管周囲細胞（ペリサイトと間藤細胞）の活性化を、血管内皮細胞については ICAM-1, CD40, COX-2 を、血管周囲細胞については HLA-DR, CD68 を指標として検討した。免疫組織化学染色の強さを段階評価し、やはり段階評価した血管内 CRP 免疫活性の強さ（したがって死亡時点での全身炎症の強さ）との関係を統計学的に解析した。その結果、脳病変がない症例においては、血管内皮細胞・血管周囲細胞の活性は全身炎症の強さに相関して亢進することが明らかになった。一方、アルツハイマー病などの脳病変が存在する場合は、全身炎症の有無に関わりなく、これら血管細胞の活性亢進を示す症例が多く見られ、脳病変がない症例で認められた相関は明らかではなかった。血管内皮細胞・血管周囲細胞の活性は全身炎症と脳実質病変の両方から影響を受けることが明らかになるとともに、これらの血管細胞が、活性化によるプロスタグランジン産生増加などの機序により、血液から脳実質へと炎症を波及させることが示唆された。

なお上記研究の過程で非ステロイド系抗炎症剤 (NSAIDs) の標的酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) の脳における発現を検討した。COX は、構造的に発現されている COX-1 と、刺激で発現が亢進する COX-2 がある。脳実質では COX-2 は神経細胞が、COX-1 はミクログリアが発現していた。本研究ではさらに、海馬 CA4 から CA3 の錐体細胞、大脳新皮質の小型神経細胞が COX-1 を、やはり構造的に発現していることを見出した。これら COX-1 陽性神経細胞において COX-2 発現が認められることは稀であった。脳における COX-1, COX-2 発現および機能は末梢臓器とかなり異なっており、NSAIDs の中枢神経系への作用については、薬剤ごとに異なる脳への移行と併せ、今後慎重

に検討し直すべき課題と考えられた。

ついで、これらのヒト剖検脳標本の所見に基づき、ラット脳の炎症性神経疾患モデルにおける解析を行った。LPS 大槽内注入 (125_g/rat) による実験的髄膜脳炎では、LPS 投与後まず脳実質ミクログリアの活性化が脳の広い範囲に認められ、ついで血液単球の浸潤が生じた。LPS 投与 1 週間後になると、活性化ミクログリアによる神経細胞の貪食像が認められた。6OHDA の内側前脳束一側破壊を事前に行った一側 CA 系抑制モデルでは、LPS 大槽内投与 1 日後において CA 系脱入力側の線状体で活性化ミクログリアがやや多い傾向が見られた。また、神経細胞による c-Fos/FLA 発現は、健常側線状体に比べ、CA 系脱入力側において明らかに亢進していた。LPS 腹腔内投与 (750_g/rat) による身体炎症の脳への波及と CA 系脱入力の影響を調べる目的には、6OHDA 局所注入による内側前脳束破壊の急性炎症性変化の影響を避けるため、6OHDA 注入後ラットを 17 ヶ月間飼育した後に LPS の腹腔内投与を行い、その 24 時間後の脳を解析した。CA 系脱入力側線状体では、健常側よりも多数の活性化ミクログリアを認めた。また c-Fos/FLA 陽性神経細胞も、健常側に比べ CA 脱入力側線状体で多数認められた。

D. 考察

様々な脳病変において低レベルの、しかし遷延した炎症反応が生じている。これは古典的な意味での炎症性疾患の病態の理解や診断的・治療的アプローチを、非常に多数の中枢性神経疾患に広げべきであることを意味している。ヒト剖検脳標本の解析から、脳の炎症（最近、神経炎症という用語が用いられている）は、局所病変と血液を介した全身炎症の両方の影響を受けることが明らかになった。

さらに 17 年度の動物モデルの解析では LPS によるミクログリア・マクローファージの活性化は、二次的に神経細胞死を引き起こすことが示された。さらに、正常では豊富なドーパミン(DA)入力がある線状体において、DA 入力が免疫・炎症反応に対して抑制的に作用していることが示

された。パーキンソン病のように DA 神経系の脱入力があらかじめ生じていると、全身炎症の波及や炎症性神経疾患が増幅され、神経細胞の急性変化である c-Fos/FRA 発現が亢進する。

脳では確かに免疫・炎症反応は起こりにくいですが、それは従来考えられていた“末梢血液からの隔離”よりも、むしろ脳の細胞が免疫系を抑制する因子を発現して抗炎症性の微小環境を維持していることによると考えられている。そのような免疫抑制性因子の候補として、今回、少なくとも線状体においては DA 系神経支配が関与していることが示唆された。同様の抑制ネットワークを形成する脳内因子として、DA 以外にも神経細胞膜蛋白質である CD200 や telencephalin, また神経伝達物質ではニューロペプチド Y やアセチルコリン（特にニコチン酸 $\alpha 7$ 受容体を介した作用）なども考えられる。したがって、神経細胞消失はそれ自体が炎症性神経疾患や身体炎症の脳への波及（臨床的には「せん妄」の形をとることが多い）の危険因子と考えられる。脳における免疫抑制性ネットワークのさらなる解明を図る必要がある。また、本研究で明らかになった神経炎症への脆弱性を有する病態において、身体炎症への早期かつ強力な治療介入が、脳病変のさらなる悪化を予防することが強く示唆される。

E. 結論

脳病変と身体炎症はともに脳の炎症性変化を悪化させる。ミクログリアの高度の活性化に代表される神経炎症は、神経細胞死を引き起こしうる。また線状体において、DA 系神経支配は免疫・炎症反応を抑制する機能も併せて担っており、その機能低下は、炎症性神経疾患の増悪、および身体炎症の脳実質への波及の促進を招いて悪性サイクルを形成する可能性が高い。

F. 研究発表

1. 論文発表

【原著（英文）】

Oshima K, [Akiyama H](#), Tsuchiya K, Kondo H, Haga C, Shimomura Y, Iseki E, Uchikado H, Kato M, Niizato K, Arai H, Relative paucity of tau

accumulation in the small areas with abundant Abeta42-positive capillary amyloid angiopathy within a given cortical region in the brain of patients with Alzheimer pathology. *Acta Neuropathol* (in press)

Uchihara T, Tsuchiya K, Nakamura A, [Akiyama H](#), Argyrophilic grains are not always argyrophilic-Distinction from neurofibrillary tangles of diffuse neurofibrillary tangles with calcification revealed by comparison between Gallyas and Campbell-Switzer methods. *Acta Neuropathol* 110:158-164, 2005

Tsuchiya K, Nakayama H, Haga C, Oshima K, Niizato K, Arai T, Matushita M, [Akiyama H](#), Distribution of cerebral cortical lesions in diffuse neurofibrillary tangles with calcification: a clinicopathological study of four autopsy cases showing prominent parietal lobe involvement. *Acta Neuropathol* 110:57-68, 2005

Uchihara T, Tsuchiya K, Nakamura A, [Akiyama H](#), Silver staining profiles distinguish Pick bodies from neurofibrillary tangles of Alzheimer type: comparison between Gallyas and Campbell-Switzer methods. *Acta Neuropathol* 109:483-489, 2005

Tsuchiya K, Murayama S, Mitani K, Oda T, Arima K, Mimura M, Nagura H, Haga C, [Akiyama H](#), Yamanouchi H, Mizusawa H, Constant and severe involvement of Betz cells in corticobasal degeneration is not consistent with pyramidal signs: a clinicopathological study of ten autopsy cases. *Acta Neuropathol* 109:353-366, 2005

Tsuchiya K, Oda T, Yoshida M, Sasaki H, Haga C, Okino H, Tominaga I, Matsui K, [Akiyama H](#), Hashizume Y, Degeneration of the inferior olive in spinocerebellar ataxia 6 may depend on disease duration: Report of two autopsy cases and statistical analysis of autopsy cases reported to date. *Neuropathology* 25:125-135, 2005

Takeda K, Araki W, [Akiyama H](#), Tabira T, Amino-truncated amyloid beta-peptide(Abeta5-40/42) produced from caspase-cleaved amyloid precursor protein is deposited in Alzheimer's disease brain. *FASEB J* 18:1755-1757, 2004

Uchikado H, [Akiyama H](#), Kondo H, Ikeda K, Tsuchiya K, Kato M, Oda T, Togo T, Iseki E, Kosaka K, Activation of vascular endothelial cells and perivascular cells by systemic inflammation - an immunohistochemical study of postmortem human brain tissues - *Acta Neuropathol* 107:341-351, 2004

[Akiyama H](#), McGeer PL, Specificity of mechanisms for plaque removal after Abeta immunotherapy for Alzheimer's disease. *Nat Med* 10: 117-118, 2004

Togo T, [Akiyama H](#), Iseki E, Uchikado H, Kondo H, Ikeda K, Tsuchiya K, de Silva R, Lees A, Kosaka K, Immunohistochemical study of tau accumulation in early stages of Alzheimer-type neurofibrillary lesions. *Acta Neuropathol* 107:504-508, 2004

Tsuchiya K, Sano M, Shiotsu H, [Akiyama H](#), Watabiki S, Taki K, Kondo H, Nakano I, Ikeda K, Sporadic amyotrophic lateral sclerosis of long duration mimicking spinal progressive muscular

atrophy exists: Additional autopsy case with a clinical course of 19 years. **Neuropathology** 24:228-235, 2004

Akiyama H, Kondo H, Arai T, Ikeda K, Kato M, Iseki E, Swab C, McGeer PL, Expression of BRI, the normal precursor of the amyloid protein of familial British dementia, in human brain, **Acta Neuropathol** 107:53-84, 2004

Arai T, Ikeda K, Akiyama H, Nonaka T, Hasegawa M, Ishiguro K, Iritani S, Tsuchiya K, Iseki E, Yagishita S, Oda T, Mochizuki A, Identification of amino-terminally cleaved tau fragments that distinguish progressive supranuclear palsy from corticobasal degeneration, **Ann Neurol** 55:71-79, 2004

Katsuse O, Iseki E, Arai T, Akiyama H, Togo T, Uchikado H, Kato M, de Silva R, Lees A, Kosaka K, 4-Repeat tauopathy sharing pathological and biochemical features of corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy, **Acta Neuropathol** 106:251-260, 2003

Arai T, Ikeda K, Akiyama H, Tsuchiya K, Iritani S, Ishiguro K, Yagishita S, Oda T, Odawara T, Iseki E, Different immunoreactivities of the microtubule-binding region of tau and its molecular basis in brains from Alzheimer's disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration, **Acta Neuropathol** 105:489-498, 2003

Arai T, Nonaka T, Hasegawa M, Akiyama H, Yoshida M, Hashizume Y, Tsuchiya K, Oda T, Ikeda K, Neuronal and glial inclusions in frontotemporal dementia with or without motor neuron disease are immunopositive for p62, **Neurosci Lett** 342:41-44, 2003

Schwab C, Hosokawa M, Akiyama H, McGeer PL. Familial British Dementia: colocalization of furin and ABri amyloid. **Acta Neuropathol** 106:278-284, 2003

【原著 (和文)】

太田聡, 土谷邦秋, 安野みどり, 秋山治彦, Semantic dementia を呈した Dementia lacking distinctive histology の 1 剖検例. **脳と神経** 57:233-238, 2005

大島健一, 土谷邦秋, 入谷修司, 新里和弘, 秋山治彦, 池田研二, 新井平伊, パーキンソン病の病理像を呈した老年期痴呆の 1 剖検例. **脳と神経** 56:603-606, 2004

大島健一, 土谷邦秋, 入谷修司, 新里和弘, 秋山治彦, 新井平伊, 池田研二, 生前に精神・神経症状を呈さなかった“進行性核上性麻痺”の 1 剖検例. **脳と神経** 56:157-161, 2004

大島健一, 土谷邦秋, 入谷修司, 新里和弘, 内原俊記, 鈴木京子, 羽賀千恵, 秋山治彦, 池田研二, 新井平伊, 瘻性対麻痺と cotton wool plaques を呈した presenilin 1 遺伝子変異(G384A)を伴う若年発症家族性アルツハイマー病の 1 剖検例. **Dementia Japan** 18:64-72, 2004

大島健一, 土谷邦秋, 入谷修司, 上野秀樹, 新里和弘, 中村亮介, 新井哲明, 秋山治彦, 池田研二, 多数の tangle を伴った argyrophilic grain dementia の 1 剖検例, **脳と神経** 55:133-138, 2003

【総説 (英文)】

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

Ikeda K, Mizuno Y, Akiyama H, Iritani S, Matsuchita M, Early diagnosis of Alzheimer's type dementia with special reference to the clinicopathology of mild cognitive impairment, **Psychogeriatrics** 4:89-95, 2005

Arai T, Akiyama H, Tsuchiya K, Iritani S, Ishiguro K, Yagishita S, Oda T, Odawara T, Iseki E, Ikeda K, Tau pathology of sporadic tauopathies. In: Takeda M, Tanaka T & Cacabelos R eds., "Molecular Neurobiology of Alzheimer Disease and Related Disorders" pp52-61, Karger, Basel, 2004

【総説 (和文)】

秋山治彦, 認知症の予防と治療, そのエビデンス 5.内科疾患からみた認知症の予防 3)神経炎症の立場から(NSAIDs なども含め). **Progress in Medicine** (in press)

秋山治彦, アミロイドβタンパク質 (Aβ), タウ, αシヌクレインとグリア, **神経精神薬理学雑誌** (in press)

秋山治彦, 病理学からみた認知症におけるニコチン性アセチルコリン受容体の意義とその機能. **Cognition and Dementia** 5:7-12, 2006

秋山治彦, 抗炎症薬による治療アプローチの現状と課題. **老年精神医学** 16 (増刊III):135-140, 2005

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

秋山治彦, アルツハイマー病の治療: NMDA 受容体拮抗薬, NSAIDs 等, **モダンフィジシャン** 25:1092-1095, 2005

秋山治彦, ミクログリアとアミロイドβ蛋白質. **医学のあゆみ** 209:905-906, 2004

秋山治彦, ミクログリアの病理学的所見. **Cognition & Dementia** 3:35-40, 2004

秋山治彦, アルツハイマー病: 抗炎症薬. **Brain Medical** 16:16-20, 2004

秋山治彦, アルツハイマー病と免疫・炎症反応—Aβワクチン, 抗炎症剤, **Dementia Japan** 17:117-125, 2003

秋山治彦, 抗炎症剤による治療の試みの現況, **老年精神医学雑誌** 14:539-544, 2003

2. 学会発表

Akiyama H, Kondo H, Haga C, Shimomura Y, Obi K, Oshima K, Tsuchiya K, Two types of Abeta removal by glial cells, 18th World Congress of Neurology, Sydney, Australia [2005/11/09]

秋山治彦 Aβワクチンと神経炎症. 第24回日本痴呆学会学術集会, 大阪 [2005/09/30].

秋山治彦 Aβ, tau, α-synuclein and glial cells. 第27回日本生物学的精神医学会, 大阪 [2005/07/08].

秋山治彦, 近藤ひろみ, 下村洋子, 羽賀千恵, 土谷邦秋 トロンピン阻害剤 PPACK (D-Phe-Pro-Arg-CMK) による実験的脳病変. 第46回日本神経病理学会総会学術研究会, 宇都宮 [2005/05/12].

秋山治彦, 土谷邦秋 アルツハイマー病老人班におけるアミロイドβ蛋白質 (Aβ) 沈着処理. 第102回日本内科学会講演会, 大阪 [2005/04/08].

秋山治彦 トロンビン阻害剤による実験的脳病変. 第32回日本脳科学会, 千葉 [2005/06/03].

秋山治彦, 土谷邦秋, 小尾公美子 ミクログリア活性化に伴う老人斑の消失過程. 第46回日本神経学会総会, 鹿児島 [2005/05/26].

秋山治彦, ミクログリア活性化とアルツハイマー病アミロイドβ蛋白質 (Aβ) 沈着の除去. 第101回日本内科学会, 東京 [2004/04/08].

秋山治彦, アルツハイマー病アミロイドβ蛋白質 (Aβ) 沈着とミクログリア. 第31回日本脳科学会, 宮崎 [2004/06/11].

秋山治彦, 池田研二, 下村洋子, 近藤ひろみ, 羽賀千恵, 土谷邦秋, 加藤雅紀, 活性化ミクログリアによるAβ沈着除去. 第23回日本痴呆学会, 東京 [2004/09/29].

秋山治彦, 近藤ひろみ, 羽賀千恵, 下村洋子, 新井哲明, 池田研二, 内門大丈, 井関栄三, 加藤雅紀, 土谷邦秋, アミロイドアンギオパチーを伴う早期アルツハイマー病変の病理学的検討, 第22回日本痴呆学会, 東京 [2003/10/04].

Akiyama H, Uchikado H, Arai T, Kondo H, Tsuchiya K, Iritani S, Oda T, Iseki E, Ikeda K, Brain inflammation and psychogeriatric diseases, 6th International conference AD/PD 2003, Seville, Spain [2003/05/10].

秋山治彦, 近藤ひろみ, 羽賀千恵, 泉山洋子, 新井哲明, 池田研二, 井関栄三, 加藤雅紀, 織田辰郎, 土谷邦秋, 神経細胞によるシクロオキシゲナーゼ(COX)-2, プロスタグランジン E2 受容体, iNOS 発現一剖検脳組織標本における検討, 第44回日本神経病理学会, 2003, 名古屋 [2003/05/30].

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

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

（総合）分担研究報告書

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

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	岡本尚子, 大和田潔, 山脇正永, 金 紅蓮, 沼田幸代, 水澤英洋	東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学
	笠間健嗣	東京医科歯科大学機器分析センター
	有賀敏夫	エーザイ株式会社
	佐野泰照, 清水文崇, 前田敏彦, 安部真彰, 中山寛人	山口大学医学部脳神経病態学神経内科
	藤井正美, 鈴木倫保	山口大学医学部脳神経病態学脳神経外科
	寺崎哲也	東北大学未来科学技術共同研究センター
	帯刀益夫	東北大学加齢医学研究所

研究要旨

中枢神経系, 末梢神経系の難治性自己免疫性疾患において, 血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) および血液神経関門 (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。BBB, BNB の首座である脳微小血管内皮細胞 (brain microvascular endothelial cells: BMECs) および末梢神経神経内膜由来内皮細胞 (peripheral nerve microvascular endothelial cells: PnMECs) について、この3年間で(1)ヒト初代培養 BMECs における特異抗原としての糖脂質の解析, (2)ヒト生検材料を用いたバリアー特異蛋白の検索, (3)ヒト BMECs の tsA58 遺伝子導入による条件的不死化細胞株の作成を行った。

A. 研究目的

1. ヒト培養脳毛細血管内皮細胞(HBMEC)の糖脂質組成: ヒト臍帯静脈由来内皮細胞との比較検討

脳毛細血管を構成する内皮細胞 (brain microvascular endothelial cell, BMEC) は

血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) の本体であり、脳実質と全身循環系の間 interface として重要なシステムである。我々はこれまでウシ脳毛細血管由来内皮細胞のほぼ純粋に近い培養系を確立してその含有糖脂質を分析、GM3 が主要酸性糖脂質であること、

GM1, GD1a, GD1b, GT1b などの酸性糖脂質も微量成分として含有すること、培養初期には SGPG の発現も見られることなどを報告した¹⁾。ヒト培養脳微小血管由来内皮細胞 (HBMEC) に関しては、不死化した細胞系列での分析データがあるのみで²⁾、より純粋な培養の困難な初代培養系列における糖脂質の解析はいままでなされていなかった。今回、我々はほぼ純粋に近い HBMEC の初代培養に成功し、その糖脂質の解析を行ったのでここに報告する。BBB を構成しない全身臓器の内皮細胞の代表としてヒト臍帯静脈由来内皮細胞 (HUVEC) を用い、その構成糖脂質との比較検討を行った。

2. 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

末梢神経系のバリアシステムである 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 (CIPD) 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³⁾⁴⁾、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⁵⁾。

3. 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

ヒト由来の in vitro BBB model は難治性免疫性疾患研究に寄与するばかりでなく、BBB

の性質、とくにヒトの BBB の特性を明らかにするために必要不可欠なツールといえる。しかしながら、健常なヒトの脳組織が得にくい点、また、仮に BMECs の一次培養に成功したとしても、その life span は短く、数回の継代で発育が停止してしまう、といった種々の理由により、その作成は困難を極めている。これまでラットやマウスを用いた BMECs の不死化細胞株樹立の報告はあるが、ヒト BMECs 由来の in vitro BBB モデル、とりわけ条件的不死化株の報告はなされていない。本研究において我々は、ヒトの脳組織から BMECs を単離し、レトロウイルスを用いて tsA58 遺伝子の導入を試みた。

B. 研究方法

1. (1) HBMEC の初代培養

68 歳女性剖検例 (肺癌、死後 14 時間) 大脳・小脳を用いた。可及的無菌的に大脳皮質・小脳皮質を切離し、複数回の洗浄後に軟膜を剥離除去した。細切ののちに Dounce homogenizer を用いてホモジナイズし、比較的大きな (BBB に関与していない) 血管を孔径 230 μ m の無菌ネットで除去した後、dispase、collagenase/dispase で酵素処理を行った。洗浄後に 15% dextran/DMEM 液に浮遊させて遠沈、pellet となった内皮細胞成分を回収して、I 型コラーゲンを塗布したプラスチック皿上に培養した。培養液としては EBM-2 培地 (Bio-Whittaker) を用いた。培養開始 10-14 日目に純度の高いコロニーをクローニングし、継代培養に移行、培養第 3 代までの細胞を用いた。

(2) 細胞系列からの糖脂質の精製

HUVEC は三光純薬から購入した。それぞれの細胞系列を 10 cm プラスティック培養皿に