

cells. We showed several lines of evidence supporting this idea [21]. First, α -GC treatment inhibited EAE induced in IFN- γ knockout mice. Secondly, α -GC treatment augmented the clinical signs of EAE induced in IL-4 knockout mice. Thirdly, blockade of CD86 polarized NKT cells toward a Th2-like phenotype with concomitant suppression of EAE, and activation of APCs by treatment with stimulatory anti-CD40 mAb biased them towards a Th1-like phenotype and exacerbated EAE. As such, EAE could be prevented when ligand stimulation would lead to selective production of Th2 cytokines by NKT cells *in vivo*. Thus we synthesized several analogs of α -GC and found that a sphingosine-truncated analog, OCH, induced selective IL-4 production by NKT cells (Fig. (3)). As expected, administration of OCH prevented development of EAE in both clinical and pathological parameters. The inhibitory effect of OCH was not observed for EAE induced either in NKT cell deficient or IL-4 knockout mice, confirming that IL-4 produced by NKT cells is critical for OCH-mediated suppression on EAE [22].

By contrast, two more reports have shown that α -GC protects mice against EAE when delivered in the immunization protocol (MOG₃₅₋₅₅ and complete Freund's adjuvant [CFA]) with subsequent multiple intraperitoneal injection or

by using a single injection at the day of induction of EAE [23,24]. More recently, Furlan R *et al.* showed that EAE was suppressed only when α -GC was administered at the time of immunization subcutaneously mixed with CFA but not administered intraperitoneally [25]. Although it is not clear the difference among these studies, the role of NKT cells in the pathogenesis or prevention of autoimmunity in CNS may depend on the stage of disease and the associated cytokine milieu, the timing or the route of administration. These parameters are critical to modulate diseases.

In addition to B6 mice, SJL mice are highly susceptible to EAE and EAE induced by immunization with proteolipid protein derived peptides PLP₁₃₉₋₁₅₁ is used as a remitting-relapsing MS model. In the context of NKT cells, SJL mice have been reported to be markedly diminished in number and cytokine production upon activation [26]. Singh AK *et al.* reported that SJL mice responded poorly to treatment with α -GC [24]. When SJL mice were treated with α -GC, the morbidity and mortality were exacerbated although the onset of disease was delayed. By contrast, a multiple injection of OCH protected SJL mice against EAE (Miyake S and Yamamura T, unpublished observation). Furthermore, OCH protected SJL mice against the relapse of EAE, suggesting

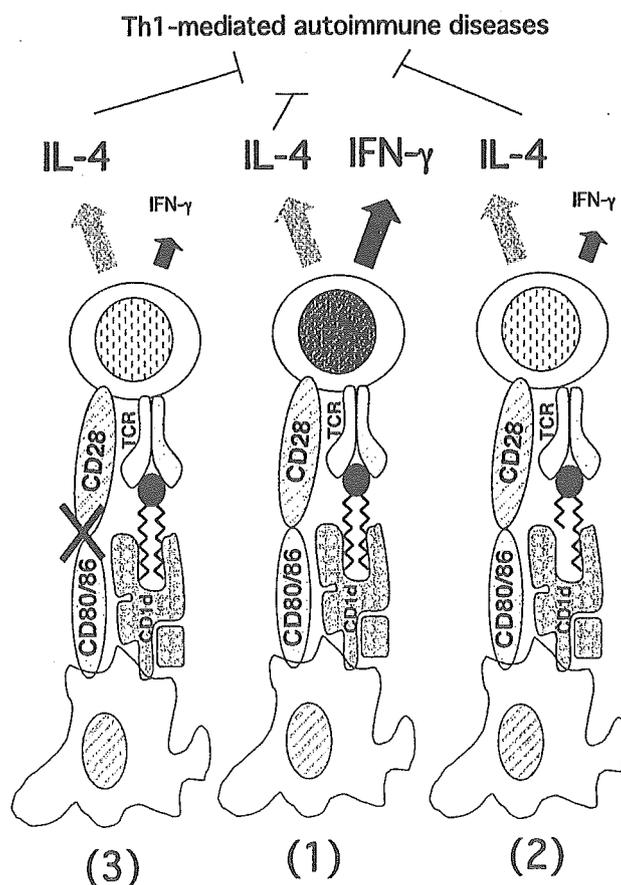


Fig. (3). Modulation of NKT cell cytokine production by an altered ligand or by co-stimulator blockade. 1) α -GC stimulates NKT cells to produce both anti-inflammatory (e.g. IL-4 and IL-10) and pro-inflammatory (e.g. IFN- γ) factors. This response can be modified by 2) stimulation with an altered ligand such as OCH or 3) stimulation in the absence of CD28/B7.2 co-stimulation. These modifications are potentially important therapeutic approach to suppress Th1-mediated autoimmune diseases.

that OCH holds possibilities as a therapeutic agent to prevent relapses for MS.

Glycolipid Therapy for Collagen-induced Arthritis

RA is an autoimmune disease characterized by persistent inflammation of joints resulting progressive destruction of cartilage and bone. Although its precise etiology is not clearly understood, cumulative evidence suggests that Th1 cells exacerbate disease, whereas Th2 cells suppress arthritis [27]. Given that NKT stimulation with OCH suppressed Th1-mediated diseases such as EAE, OCH might be an effective therapeutic reagent for CIA which serves as an animal model for RA. We have demonstrated that OCH administration inhibited the clinical course of CIA induced in B6 mice by immunization with the chicken type II collagen [28]. Histological analysis revealed that OCH treatment protected against infiltration of inflammatory cells and destruction of cartilage and bone. The suppressive effect of OCH was not observed for CIA induced either in CD1d knockout mice or in $\alpha 18$ knockout mice deficient in NKT cells. We also observed OCH suppressed CIA induced in DBA/1J mice immunized with bovine type II collagen. Moreover, injection of OCH strongly suppressed CIA in SJL mice even though these mice have defects in numbers and functions of NKT cells, and even after the arthritis had already developed. By contrast, administration of α -GC didn't suppress arthritis in any of these three models. Suppression of arthritis was associated with the elevation of IgG1:IgG2a ratio indicating the Th2 bias of type II collagen-reactive T cells. Injection of neutralizing antibody to either IL-10 or IL-4 reversed the beneficial effect of OCH treatment. These results imply that IL-10 and IL-4 are critical in the OCH-mediated suppression of CIA and are consistent with our idea that OCH modulated CIA by stimulating the production of Th2 cytokines from NKT cells although the source of IL-10 remains to be elucidated. Since OCH seems a potential therapeutical tool to suppress arthritis, the role of NKT cells in the natural course of arthritis should be clarified in the future.

Glycolipid Therapy for Autoimmune Diabetes in NOD Mice

Nonobese diabetic (NOD) mice develop a spontaneous autoimmune diabetes similar to the human T1D. Autoimmune destruction of β cells is preceded by infiltration of pancreatic islets by macrophages, B cells and T lymphocytes [29,30]. Many studies have indicated that Th1 type CD4⁺ cells and CD8⁺ T cells have been implicated in the development of diabetes in the NOD mouse. In parallel with these effector cells, the regulatory cells including NKT cells have been suggested to inhibit the development of diabetes. Although the mechanisms of suppressive effect of these regulatory T cells are not fully understood, it is believed that an imbalance between autoreactive effector T cells and regulatory T cells may trigger the development of destructive insulinitis and diabetes [28].

Studies have indicated that NOD mice were deficient in the number and function of NKT cells [31]. Although the correlation between a defect in NKT cells and the suscepti-

bility of diabetes in NOD mice is still debated [3,32,33], the putative involvement of NKT cells in the control of islet β -cell reactive T cells in NOD mice was suggested by prevention of diabetes following infusion of NKT cell enriched thymocytes preparations [34] and by the increase of NKT cells in V α 14J α 281 transgenic NOD mice [35].

Several recent papers investigated the effect of treating NOD mice with α -GC [33,35-38]. When started around three or four weeks of age, repeated injections at least once a week delayed the onset and reduced the incidence of diabetes. After treatment, splenocytes from NOD mice produced a greater amount of IL-4 in response to islet antigens and the IgG1/IgG2a (Th2/Th1) ratio of anti-GAD antibody increased. Thus it appears that the mechanism of protection is similar to that observed by increasing the numbers of NKT cells in NOD mice and by α -GC treatment in other autoimmune disease models such as EAE and CIA. This effect was auto-antigen specific as no difference was observed in the immune response to ovalbumin [36]. However, the mechanism in which glycolipid treatment induces an auto-antigen specific switch in the immune response of NOD mice is unclear. We also observed the protective effect of OCH treatment in NOD diabetic mice in addition to α -GC treatment. The protective effect for insulinitis by OCH was more profound compared to that by α -GC [56].

GLYCOLIPID THERAPY FOR MOUSE MODELS OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

It has been reported that a selective reduction in NK1.1⁺ T cells precedes the development of autoimmunity in MRL lpr/lpr mice. Mieza MA *et al.* also found a decrease in the expression of invariant V α 14 TCR mRNA of NKT cells before the onset of lymphocyte accumulation and autoimmune disease in MRL lpr/lpr mice, C3H gld/gld and NB/W F1 mice when compared to control mice [39]. Recently, Zeng D *et al.* demonstrated that treatment of NZB/W F1 mice with anti-CD1d monoclonal antibody augmented Th2-type responses, increased serum levels of IgE, decreased levels of IgG2a and IgG2a anti-double-stranded DNA (dsDNA) antibodies, and ameliorated lupus [40]. They also showed that multiple injection of α -GC induced an enhanced Th1-type response and exacerbated lupus associated with decreased serum levels of IgE and increased levels of IgG2a and IgG2a anti-ds DNA antibodies. This exacerbation of disease was associated with reduced IL-4 and tumor necrotic factor- α production and expansion of marginal zone B cells. These results suggested that activation of NKT cells augmented Th1-type responses and autoantibody production that contribute to lupus development in NZB/W F1 mice. In contrast, Yang JQ *et al.* reported that pristane-induced lupus nephritis was accelerated when induced in CD1d deficient mice [41]. They also demonstrated that repeated injection of α -GC resulted in the expansion of NKT cells and ameliorated dermatitis in MRL lpr/lpr mice [42]. Thus they postulated that NKT cells may play a protective role in lupus models. Since lupus models are not simply explained by only Th1-mediated or Th2-mediated pathology, the complexity of these models may explain the differences in results in these studies.

NKT Cells in Human Autoimmune Diseases

Multiple Sclerosis

MS is an autoimmune demyelinating disease of the CNS. Illes Z *et al.* reported a reduction in V α 24J α 18 cells among V α 24⁺ cells from the peripheral blood of patients with MS compared to healthy subjects using single-strand conformation polymorphism method to detect TCR gene rearrangements [43]. Van der Vliet *et al.* showed a decrease in the number of NKT cells by screening of V α 24⁺V β 11⁺ cells in the blood [44]. Araki M *et al.* demonstrated that DN NKT cells in the periphery were greatly reduced in remission whereas the reduction of CD4⁺ NKT cells was marginal [45]. Furthermore CD4⁺ NKT line cells expanded from MS in remission produced a larger amount of IL-4 than those from healthy subjects or from MS in relapse. Therefore, we speculated that the Th2 bias of CD4⁺ NKT cells may play a role in the regulation of Th1 type autoantigen reactive T cells. In contrast, Gausilng *et al.* did not find a significant difference in the number of DN V α 24⁺ NKT cells in PBL between from MS patients and from healthy controls [46]. The basis for the discrepancy between the number of NKT cells among these studies is not clear. Considering that the proportion of V α 24J α 18 T cells in normal individuals varies among studies, it may not be easy to compare these studies.

Type I Diabetes

Studies of the frequency of human NKT cells in PBMCs in patients with T1D have had conflicting results. In initial studies, Wilson B *et al.* studied identical twin/triplet sets discordant for disease, and reported that diabetic siblings have lower frequencies of DN V α 24J α 18 T cells in their peripheral blood than non-diabetic siblings [47]. In addition, Kukreja AG *et al.* showed a reduction in the number of NKT cells in newly diagnosed patients [48]. However, more recent papers reported unaltered or increased NKT cells in recent-onset patients with type I diabetes [49,50]. Wilson B *et al.* also showed that DN V α 24J α 18 T cell clones isolated from diabetics had an impaired ability to produce IL-4 [47]. In contrast, Lee PT *et al.* reported IL-4 production by NKT cells was similar among these groups as assessed by intracytoplasmic staining following short-term PMA and ionomycin stimulation [49]. At this stage, it is hard to interpret the discrepancies between these results, since the methods for detecting NKT cells and the functional assays used differ between these studies.

Systemic Autoimmune Disease

Sumida and colleagues found that $\alpha\beta$ ⁺ DN T cells were increased in Scleroderma patients and that there was oligoclonal expansion of V α 24⁺TCR⁺ cell among these cells [51]. Although the invariant V α 24J α 18 T cells were dominant among these cells from healthy donors, invariant V α 24J α 18 T cells were replaced by clones with other V α 24 TCR⁺ cells in Scleroderma patients. In addition, Maeda *et al.* have reported the expansion of non-invariant V α 24 TCR⁺ cells but not V α 24J α 18 T cells in the synovium of RA patients [52]. Similar to this study, these authors observed the expansion of non-invariant V α 24 TCR⁺ clones in patients with active SLE [53, 54]. Furthermore, following prednisolone therapy,

V α 24J α 18 T cells increased among V α 24 TCR⁺ cells. The recovery of V α 24J α 18 T cells in patients with prednisolone therapy was also observed among patients with MS (Araki M and Yamamura T, unpublished observation). Kojo S *et al.* and other groups investigated the number of NKT cells using V α 24 and V β 11 mAb to detect NKT cells in patients with several different autoimmune diseases, including SLE, Scleroderma and RA [43, 55]. They found lower numbers of V α 24⁺V β 11⁺ NKT cells in the peripheral blood than controls. Kojo S *et al.* also showed in this study that half of the patients with autoimmune disease responded to α -GC in culture.

PROSPECTS FOR GLYCOLIPID THERAPY FOR AUTOIMMUNE DISEASES

It remains unclear whether the defect in NKT cells is causal for autoimmune disease or occur as a secondary consequence of the autoimmune process. However, given the efficacy of OCH and α -GC in mouse models, stimulation of NKT cells with glycolipid antigens seems to be an attractive strategy for the treatment of autoimmune diseases. Although several studies have shown that administration of α -GC caused liver damage, the hepatotoxicity was minimal in Phase I trials of α -GC for patients with cancer. Given the lack of severe toxicity in humans, it seems reasonable to use glycolipids for the prevention or therapy of selected human autoimmune disorders. α -GC has been shown to exacerbate EAE, depending on the strain of mouse and stage of disease tested and to have only a marginal effect on CIA. In this situation, treatment with OCH might be preferable to α -GC for Th1-mediated diseases such as MS, type I diabetes and RA, as OCH elicits a predominantly IL-4 response rather than IFN- γ in contrast to α -GC, which might afford greater protection from EAE and MS.

Both rodent and human NKT cells have been reported to recognize α -GC in the context of CD1d. OCH also stimulates human NKT cells, particularly CD4⁺ NKT cells, and OCH stimulation induces more Th2 cytokine production from NKT cells compared to α -GC stimulation (Araki M and Yamamura T, unpublished observation). The evolutionary conservation and the homogeneous ligand specificity of NKT cells allow us to apply a glycolipid ligand like OCH for the treatment of human disease without considering species barrier or genetic heterogeneity of humans.

CONCLUSION

In this review, we have discussed the supporting data for the role of NKT cells in the regulation of autoimmune diseases. Ligand stimulation of NKT cells is an attractive strategy for prevention or treatment of autoimmune diseases. However, the mechanisms by which NKT cells exert their immunoregulatory functions are still largely unknown and a number of questions require further investigation including the mechanism to recruit NKT cells and control its functions at inflammatory sites and the interaction of other subsets of cells. To clarify the nature of natural ligands for NKT cells is one of the major questions and it could be an interesting natural source of useful ligands for CD1-restricted regulatory cells.

ABBREVIATIONS

NKT	=	Natural killer T
MHC	=	Major histocompatibility complex
α -GC	=	α -galactosylceramide
EAE	=	Experimental autoimmune encephalomyelitis
CIA	=	Collagen induced arthritis
Th	=	T helper
IL	=	Interleukin
IFN	=	Interferon
T1D	=	Type 1 diabetes
MS	=	Multiple sclerosis
RA	=	Rheumatoid arthritis
TCR	=	T cell receptor
DN	=	Double negative
NF-AT	=	Nuclear factor of activated T cells
APC	=	Antigen presenting cell
CNS	=	Central nervous system
B6	=	C57BL/6
MOG	=	Myelin oligodendrocyte glycoprotein
CFA	=	Freund's complete adjuvant
NOD	=	Nonobese diabetic
dsDNA	=	Double-stranded DNA

REFERENCES

- Walker, L.S.K. and Abbas, A.K. (2002) *Nat. Rev. Immunol.*, 2(1), 11-19.
- Hammond, K.J.L. and Godfrey, D.I. (2002) *Tissue Antigens*, 59(5), 353-363.
- Wilson, S.B. and Delovitch, T.L. (2003) *Nat. Rev. Immunol.*, 3(3), 211-222.
- Porcellini, S.A. and Modlin, R.L. (1999) *Annu. Rev. Immunol.*, 17, 297-329.
- Kronenberg, M. and Gapin, L. (2002) *Nat. Rev. Immunol.*, 2(8), 557-568.
- Gumperz, J.E.; Miyake, S.; Yamamura, T. and Brenner, M.B. (2002) *J. Exp. Med.*, 195(5), 625-636.
- van Der Vliet, H.J.; Nishi, N.; de Grujil, T.D.; von Blomberg, B.M.; van den Eertwegh, A.J.; Pinedo, H.M.; Giaccone, G. and Scheer, R.J. (2000) *Blood*, 95(7), 2440-2442.
- D'Andrea, A.; Goux, D.; De Lalla, C.; Koezuka, Y.; Montagna, D.; Moretta, A.; Dellabona, P.; Casorati, G. and Abrignani, S. (2000) *Eur. J. Immunol.*, 30(6), 1544-1550.
- Park, S.H.; Benlagha, K.; Lee, D.; Balish, E. and Bendelac, A. (2000) *Eur. J. Immunol.*, 30(2), 620-625.
- Kawano, T.; Cui, J.; Koezuka, Y.; Toura, I.; Kaneko, Y.; Motoki, K.; Ueno, H.; Nakagawa, R.; Sato, H.; Kondo, E.; Koseki, H. and Taniguchi, M. (1998) *Science*, 391(5343), 177-181.
- Brossay, L.; Chioda, M.; Burdin, N.; Koezuka, Y.; Casorati, G.; Dellabona, P. and Kronenberg, M. (1998) *J. Exp. Med.*, 188(8), 1521-1528.
- Spada, F.M.; Koezuka, Y. and Porcellini, S.A. (1998) *J. Exp. Med.*, 188(8), 1529-1534.
- Wu, D.Y.; Segal, N.H.; Sidobre, S.; Kronenberg, M. and Champan, P.B. (2003) *J. Exp. Med.*, 198(1), 173-181.
- Stetson, D.B.; Mohrs, M.; Reinhardt, R.L.; Baron, J.L.; Wang, Z.-E.; Gapin, L.; Kronenberg, M. and Locksley, R.M. (2003) *J. Exp. Med.*, 198(7), 1069-1076.
- Ansel, K.M.; Lee, D.U. and Rao, A. (2003) *Nat. Immunol.*, 4(7), 616-623.
- Oki, S.; Chiba, A.; Yamamura, T. and Miyake, S. (2004) *J. Clin. Invest.*, 113(11), 1631-1640.
- Shibasaki, F.; Price, E.R.; Milan, D. and McKeon, F. (2000) *Nature*, 382(6589), 370-373.
- Owens, T.; Wekerle, H. and Antel, J. (2001) *Nat. Med.*, 7(2), 161-166.
- Chen, L.Z.; Hochwald, G.M.; Huang, C.; Dakin, G.; Tao, H.; Cheng, C.; Simmons, W.J.; Dranoff, G. and Thorbecke, G.J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(21), 12516-12521.
- Croxford, J.L.; Feldman, M.; Chernajovsky, Y. and Baker, D. (2001) *J. Immunol.*, 166(6), 4124-4130.
- Pal, E.; Tabira, T.; Kawano, T.; Taniguchi, M.; Miyake, S. and Yamamura, T. (2001) *J. Immunol.*, 166(1), 662-668.
- Miyamoto, K.; Miyake, S. and Yamamura, T. (2000) *Nature*, 413(6855), 531-534.
- Jahng, A.W.; Maricic, I.; Pedersen, B.; Burdin, N. and Naidenko, O. (2001) *J. Exp. Med.*, 194(12), 1789-1799.
- Singh, A.K.; Wilson, M.T.; Hong, S.; Oliveres-Villagomez, D.; Du, C.; Stanic, A.K.; Joyce, S.; Siriam, S.; Kozeka, Y. and Van Kaer, L. (2001) *J. Exp. Med.*, 194(12), 1801-1811.
- Furlan, R.; Bergami, A.; Cantarella, D.; Brambilla, E.; Taniguchi, M.; Dellabona, P.; Casorati, G. and Martino, G. (2003) *Eur. J. Immunol.*, 33(7), 1830-1838.
- Yoshimoto, T.; Bendelac, A.; Hu-Li, J. and Pau, W.E. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(25), 11931-11934.
- Van Roon, J.A. G.; Lafeber, F.P.J.G. and Bijlsma, J.W.J. (2001) *Arthritis. Rheum.*, 44(1), 3-12.
- Chiba, A.; Oki, S.; Miyamoto, K.; Hashimoto, H.; Yamamura, T. and Miyake, S. (2001) *Arthritis. Rheum.*, 50(1), 305-313.
- Delovitch, T.L. and Singh, B. (1997) *Immunity*, 7(6), 727-738.
- Yoshida, K. and Kikutani, H. (2000) *Rev. Immunogenetics.*, 2(1), 140-146.
- Gombert, J.-M.; Herbelin, A.; Tancrede-Bohin, E.; Dy, M.; Carnaud, C. and Bach, J.-F. (1996) *Eur. J. Immunol.*, 26(12), 2989-2998.
- Shi, Fu-D.; Flodstrom, M.; Balasa, B.; Kim, S.H.; Van Gunst, K.; Strominger, J.L.; Wilson, B. and Sarvetnick, N. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(12), 6777-6782.
- Wang, B.; Geng, Y.-B. and Wang, C.-R. (2001) *J. Exp. Med.*, 194(3), 313-319.
- Hammond, K.J.L.; Poulton, L.D.; Almisano, L.J.; Silveira, P.A.; Godfrey, D.I. and Bazter, A.G. (1998) *J. Exp. Med.*, 187(7), 1047-1056.
- Lehuen, A.; Lantz, O.; Beaudoin, L.; Laloux, V.; Carnaud, C.; Bendelac, A.; Bach, J.-F. and Monteiro, R.C. (1998) *J. Exp. Med.*, 188(9), 1831-1839.
- Sharif, S.; Arreaza, G.A.; Zucker, P.; Mi, Q.-S.; Sondhi, J.; Naidenko, O.V.; Kronenberg, M.; Koezuka, Y. and Delovitch, T.L.; Gombert, J.-M.; Leite-de-Moraes, M.; Gouarin, C.; Zhu, R.; Haneg, A.; Nakayama, T.; Taniguchi, M.; Lepault, F.; Lehuen, A.; Bach, J.-F. and Herbelin, A. (2001) *Nat. Med.*, 7(9), 1057-1062.
- Hong, S.; Wilson, M.T.; Serizawa, I.; Wu, L.; Singh, N.; Naidenko, O.V.; Miura, T.; Haba, T.; Scherer, D.C.; Wei, J.; Kronenberg, M.; Koezuka, Y. and Van Kaer, L. (2001) *Nat. Med.*, 7(9), 1052-1056.
- Naumov, Y.N.; Bahjat, K.S.; Gausling, R.; Abraham, R.; Exley, M.A.; Koezuka, Y.; Balk, S.B.; Strominger, J.L.; Clare-Salzer, M. and Wilson, S.B. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(24), 13838-13843.
- Mieza, M.A.; Itoh, T.; Cui, J.Q.; Makino, Y.; Kawano, T.; Tsuchida, K.; Koike, T.; Shirai, T.; Yagita, H.; Matsuzawa, A.; Koseki, H. and Taniguchi, M. (1996) *J. Immunol.*, 156(10), 4035-4040.
- Zeng, D.; Liu, Y.; Sidobre, S.; Kronenberg, M. and Strober, S. (2003) *J. Clin. Invest.*, 112(8), 1211-1222.
- Yang, J.Q.; Singh, A.K.; Wilson, M.T.; Satoh, M.; Stanic, A.K.; Par, J.-J.; Hong, S.; Gadola, S.D.; Mizutani, A.; Kakumanu, S.R.; Reeves, W.; Cerundolo, V.; Joyce, S.; Van Kaer, L. and Singh, R.R. (2003) *J. Immunol.*, 171(4), 2142-2153.
- Yang, J.-Q.; Saxena, V.; Xu, H.; Van Kaer, L.; Wang, C.-R. and Singh, R.R. (2003) *J. Immunol.*, 171(8), 4439-4446.
- Illes, Z.; Kondo, T.; Newcombe, J.; Oka, N.; Tabira, T. and Yamamura, T. (2000) *J. Immunol.*, 164(8), 4375-4381.

- [44] Van der Vliet, H.J.J.; von Blomberg, B.M.E.; Nishi, N.; Reijm, M.; Voskuyl, A.E.; van Bodegraven, A.; Polman, C.H.; Rustemeyer, T.; Lips, P.; van den Eertwegh, A.J.M.; Giaccone, G.; Scheper, R.J. and Pinedo, H.M. (2001) *Clin. Immunol.*, **100**(2), 144-148.
- [45] Araki, M.; Kondo, T.; Gumperz, J.E.; Brenner, M.B.; Miyake, S. and Yamamura, T. (2003) *Int. Immunol.*, **15**(2), 279-288.
- [46] Gausling, R.; Trollmo, C. and Hafler, D.A. (2001) *Clin. Immunol.*, **98**(1), 11-17.
- [47] Wilson, S.B.; Kent, S.C.; Patton, K.T.; Orban, T.; Jackdon, R.A.; Exley, M.; Porcelli, S.; Schatz, D.A.; Atkinson, M.A.; Balk, S.P.; Strominger, J.L. and Hafler, D.A. (1998) *Nature*, **391**(6663), 177-181.
- [48] Kukreja, A.; Cost, G.; Marker, J.; Zhang, C. Sun, Z.; Lin-Su, K.; Ten, S.; Sanz, M.; Exley, M.; Wilson, B.; Porcelli, S.; Maclaren, N. (2002) *J. Clin. Invest.*, **109**(1), 131-140.
- [49] Lee, P.T.; Putnam, A.; Benlagha, K.; Teyton, L.; Gottlieb, P.A. and Bendelac, A. (2002) *J. Clin. Invest.*, **110**(6), 793-800.
- [50] Oikawa, Y.; Shimada, A.; Yamada, S.; Motohashi, Y.; Nakagawa Y.; Irie, J.; Maruyama, T. and Saruta, T. (2002) *Diabet. Care* **25**(10), 1818-1823.
- [51] Sumida, T.; Sakamoto, A.; Murata, H.; Makino, Y.; Takahashi, H. Yoshida, H.; Nishioka, K.; Iwamoto, I. and Taniguchi, M. (1995) *J. Exp. Med.*, **182**(4), 1163-1168.
- [52] Maeda, T.; Keino, H.; Asahara, M.; Taniguchi, M.; Nishioka, K. and Sumida, T. (1999) *Rheumatology*, **38**(2), 186-188.
- [53] Oishi, Y.; Sumida, T.; Sakamoto, A.; Kita, Y.; Kurasawa, K. Nawata, Y.; Takabayashi, K.; Takahashi, H.; Yoshida, S.; Taniguchi, M.; Saito, Y. and Iwamoto, I. (2001) *J. Rheumatol.*, **28**(2), 275-283.
- [54] Sumida, T.; Maeda, T.; Taniguchi, M.; Nishioka, K. and Stohl, W. (1998) *Lupus*, **7**(8), 565-568.
- [55] Kojo, S.; Adachi, Y.; Keino, H.; Taniguchi, M. and Sumida, T. (2001) *Arthritis. Rheum.*, **44**(5), 1127-1138.
- [56] Mizuno, M.; Masumura, M.; Tomi, C.; Chiba, A.; Oki, S.; Yamamura, T.; Miyake, S. (2004) *J. Autoimmune*, **23**, 293-300.

NKT 細胞と自己免疫 調節性 CD4⁺ NKT 細胞の役割

山村 隆

NKT 細胞は免疫疾患発症の鍵となる調節細胞で、CD1d に提示された糖脂質を認識し大量のサイトカインを産生する。自己免疫疾患では NKT 細胞の減少や機能の変調が報告され、病態との関連が推測されてきた。しかし最近、IL-4 は主に CD4⁺ NKT 細胞が産生することがわかり、CD4⁻ CD8⁻ (double-negative ; DN) 細胞で NKT 細胞を代表させてきた以前の研究の見直しが必要となっている。多発性硬化症 (MS) の寛解期では、DN NKT 細胞は減少するが CD4⁺ NKT 細胞は残存し、残った CD4⁺ NKT 細胞は Th2 にシフトしている。DN NKT 細胞と CD4⁺ NKT 細胞が異なる機能を発揮し、MS の抑制に重要なのは CD4⁺ NKT 細胞であることが推測される。

Key words NKT cell, multiple sclerosis, autoimmunity, Th1/Th2

NKT 細胞研究は新たな局面へ

自己反応性 T 細胞の一部は胸腺で除去されないことや、残存した自己反応性 T 細胞の寛容維持に調節細胞が関与することが広く認識されている。自己免疫疾患の発症を抑制する調節細胞の研究は、疾患病態の理解や治療法の開発を進めるうえできわめて重要である。CD1d 拘束性 NKT 細胞は調節細胞のなかでも特に際立ったサイトカイン産生能をもつユニークな細胞集団で、その自己免疫病態における役割、治療標的としての意義が論じられてきた。

NKT 細胞と自己免疫疾患の関係については、1995 年に強皮症の末梢血における数の減少¹⁾ が報告されて以来、動物モデルやヒトの自己免疫疾患において、細胞数の減少や機能異常が示されている²⁻⁷⁾。1 型糖尿病 (insulin-dependent diabetes mellitus ;

IDDM) については最初の報告が追試できず混乱を生じているが^{8,9)}、筆者らは多発性硬化症 (multiple sclerosis ; MS) の末梢血で NKT 細胞の数や機能に変化が生じていることを繰り返し確認している^{5,10)}。

NKT 細胞に関する情報は膨大なものとなっているが、その多くは CD4⁻ CD8⁻ (double-negative ; DN) NKT 細胞で NKT 細胞全体を代表させるか、NKT 細胞全体をバルクで解析して得られたものである。しかし、CD4⁺ NKT 細胞と DN NKT 細胞が異なる性格をもつことが最近になってわかり^{11,12)}、両者を区別して論じる必要性が生じている。筆者らは最近、MS の寛解期に CD4⁺ NKT 細胞と DN NKT 細胞に異なる変化が生じることを見出し¹⁰⁾、CD4⁺ NKT 細胞が免疫調節細胞として重要な機能を発揮することを示唆している。

本稿では、NKT 細胞と自己免疫疾患に関する最近

Current controversy on NKT cells and autoimmune diseases : The role of regulatory CD4⁺ NKT cells

Takashi Yamamura

国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部

やまむら・たかし 1980 年京都大学医学部卒業。西独マックス・プランク研究所、ハーバード大学留学を経て、90 年国立精神・神経センター神経研究所室長、99 年同免疫研究部部長 (現在に至る)。専門は神経系自己免疫と免疫療法の開発。

表1 ヒトDN NKT細胞とCD4⁺NKT細胞の比較

	産生 サイトカイン	NK マーカー	ケモカイン レセプター	その他
DN NKT 細胞	IFN- γ	2B4	CCR5	IL-2, IL-12 でパーフォリン誘導
	TNF- α	CD94	CCR6	
		NKG2A	CXCR3	
		NKG2D	CXCR4	
		CD16†	CXCR6	
CD4 ⁺ NKT 細胞	IFN- γ	2B4	CCR5	CD49a
	TNF- α	CD16†	CCR6	CD95L
	IL-2		CXCR3	
	IL-4		CXCR4	
	IL-5		CXCR6	
	IL-6			
	IL-10			
	IL-13			

DN NKT 細胞または CD4⁺NKT 細胞に選択的に発現する分子は下線で示した。詳細については文献^{11, 12)}を参照されたい。

の知見を紹介し、自己免疫病態におけるNKT細胞サブセットそれぞれの役割、治療標的としての意義などについて考察する。

ヒトNKT細胞に関する研究の動向

NKT細胞はCD4⁺分画とDN分画に分かれ、MHC類似で多型性のないCD1d分子に結合した糖脂質を認識する。そのT細胞抗原レセプター(TCR)はクローン間で高度に保存されており、TCR α 鎖ではインバリエント鎖(マウスではV α 14-J α 281, ヒトではV α 24-J α Q), β 鎖では特定の遺伝子セグメント(マウスV β 8.2, ヒトV β 11)を高頻度に使用する。ヒトCD1d拘束性NKT細胞は数の少ない細胞集団であり(末梢血リンパ球の~0.1%), 機能の解析に十分な細胞数を得るために糖脂質 α -ガラクトシルセラミド(α -galactosylceramide; α -GC)やフィトヘマグルチニン(PHA)刺激により樹立したNKT細胞クローンが利用されている。また、末梢血NKT細胞を*ex vivo*で解析する方法として、近年CD1dテトラマーが開発され^{11, 12)}, α -GCを結合させたテトラマー(α -GC/CD1dテトラマー)による研究が進んでいる。

これまでヒトNKT細胞は相対的に数の多いDN細胞で代表されることが多かったが、最近CD4⁺

NKT細胞がDN NKT細胞と機能的に異なる系列である可能性が2つの研究グループから同時に報告された^{11, 12)}。これらの研究では α -GC/CD1dテトラマーと抗TCR抗体を組み合わせて健常者末梢血NKT細胞を同定し、その細胞内サイトカインや表面抗原を評価している。その結果、IFN- γ や腫瘍壊死因子 α (TNF- α)のような炎症性サイトカインの産生についてはDN NKT細胞とCD4⁺NKT細胞間で差がないが、IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13などのTh2サイトカインはCD4⁺NKT細胞により選択的に産生されることがわかった。また、NK細胞マーカーであるNKG2D分子やCD94分子は主にDN NKT細胞で発現し、CD4⁺NKT細胞での発現は比較的まれであった(表1)。

これらの結果から、DN NKT細胞はNK細胞のような細胞傷害活性や細胞内感染に対する免疫応答増強効果を発揮し、CD4⁺NKT細胞はサイトカイン産生を介して免疫調節細胞として働くのではないかと考えられている。Th1自己免疫病を抑制するTh2サイトカインを産生するのはCD4⁺NKT細胞に限られるという点は、病態解析を行ううえで特に重要な新見である。

自己免疫疾患における NKT 細胞の変化

1. IDDM における論争

末梢血の NKT 細胞頻度の減少は、強皮症¹⁾、IDDM⁴⁾、全身性エリテマトーデス (SLE)⁶⁾、関節リウマチ⁶⁾、MS^{5, 10)}、炎症性腸炎⁷⁾などで報告されているが、その機能まで解析されたのは IDDM のみであった。Wilson らは、IDDM の発症者では DN NKT 細胞の数が減少するとともに IL-4 産生能が低下し、これが糖尿病発症の一因ではないかと報告した⁴⁾。糖尿病を自然発症する NOD マウスにおいて膵島炎に先立って NKT 細胞の数や機能の異常がみられることもあわせて、IDDM における NKT 細胞の変化が意味のあるものとして議論されてきた。しかし、最近の研究によれば、健常者の未処理 DN NKT 細胞は IL-4 を産生しないのに^{11, 12)}、Wilson らのアッセイでは検出されたこと、IDDM 発症者における NKT 細胞数の減少が追試確認できなかったことなどから^{8, 9)}、以前の実験に問題がある可能性や IDDM 発症と NKT 細胞の関連を否定するような議論⁸⁾も現れている。研究結果が乖離した理由については不明といわざるをえないが、*in vitro* のバイアス、サンプル処理の問題などが考えられる。一方、CD1d テトラマーを使っていない研究は評価に耐えないという Bendelac らの論調⁹⁾には賛同できない(後述)。

2. MS の寛解期では DN NKT 細胞が減少するが CD4⁺NKT 細胞は保存される

MS は中枢神経自己抗原に反応する Th1 細胞が炎症の引き金を引く自己免疫疾患で、典型例では再発と寛解を繰り返す。自己免疫疾患の病勢はしばしば変動するが、MS ではそれが特に明瞭に現れる。再発の引き金を引くのはウイルス感染などの外来因子と考えられるが、水溶性ステロイドの点滴パルス療法によって通常 1 か月程度で寛解に入る。寛解はステロイド剤や免疫抑制剤を投与しなくても、3 か月以上持続することが多い。筆者らは以前、MS 患者末梢血における NKT 細胞 V α 24-J α Q インバリアント鎖 mRNA 発現減少を SSCP (single strand conforma-

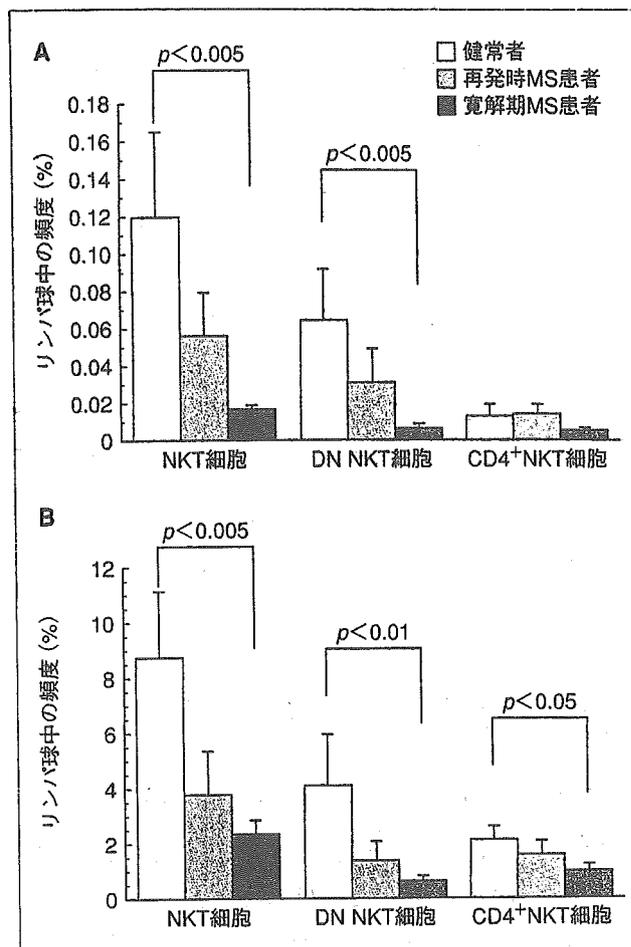


図1 末梢血中の NKT 細胞頻度

A : MS 患者および健常者末梢血の NKT 細胞頻度。健常者、再発時 MS 患者、寛解期 MS 患者の末梢血 PBMC を分離し、抗 V α 24, V β 11, CD4, CD8 抗体の多重染色により、総 NKT 細胞数 (V α 24⁺V β 11⁺)、DN NKT 細胞数、CD4⁺NKT 細胞数を算定し、リンパ球中の頻度を % で表した。寛解期 MS と健常者を比較すると、NKT 細胞総数と DN NKT 細胞数において有意な変化 (MS における減少) がみられた。しかし CD4⁺NKT 細胞数では、各群間に有意差はみられなかった。

B : α -GC 刺激 1 週間後の培養 PBMC の NKT 細胞頻度。未刺激 PBMC を使った解析結果 (A) と同様の結果が得られた。

(Araki M et al : *Int Immunol* 15, 279-88, 2003¹⁰⁾ より)

tion polymorphism) 法によって示した⁵⁾。NKT 細胞数の変化をより詳細に評価するために、最近フローサイトメーターにより DN NKT 細胞と CD4⁺NKT 細胞の数を算定した¹⁰⁾(図 1)。ここでは NKT 細胞は TCR V α 24 と TCR V β 11 ダブルポジティブの細胞と定義した。検討の結果、寛解期にある MS 患者では健常者に比較して NKT 細胞の総数 (V α 24⁺V β 11⁺ 細胞数) が著明に減少していることが確認された。

しかしMSの再発時には、NKT細胞の減少はむしろ軽度であり、NKT細胞が減るほど自己免疫病態が悪くなるという単純な解釈は成立しないことがわかった。DN NKT細胞についても、NKT細胞全体と同じようにMS寛解期での著明な減少、MS再発時の軽度の減少が確認された。しかし、 $CD4^+$ NKT細胞については、MS再発時および寛解期において有意な減少は認められなかった(図1A)。また、末梢血単核球(PBMC)を α -GCで刺激してから1週間後の培養細胞を使った検討でも、DN NKT細胞の減少に比較して $CD4^+$ NKT細胞の減少は軽度であることが確認された(図1B)。すなわち、MS患者におけるNKT細胞の減少は、寛解期に特徴的であり、かつDN NKT細胞の減少が著しいことが示された。

3. MSの寛解期では $CD4^+$ NKT細胞がTh2にシフト

次に筆者らは、健常対照またはMS患者に由来するPBMCを α -GCで刺激して3週間培養後、増殖したNKT細胞($CD4^+$ またはDN)をセルソーターで分離してサイトカインプロファイルを評価した。具体的には、分離した細胞を抗CD28抗体/抗CD3抗体でコートしたビーズにより刺激し、その培養上清中のIL-4とIFN- γ 濃度を測定した。その結果、IL-4の主な産生細胞はDNではなく $CD4^+$ NKT細胞であることが確認された。次に寛解期のMS患者と健常者から誘導されたDNおよび $CD4^+$ NKT細胞のIL-4、IFN- γ 産生能を直接比較した。その結果、DN NKT細胞については、MS寛解期でIL-4、IFN- γ ともに産生低下の傾向がみられたのに対し、 $CD4^+$ NKT細胞ではMS寛解期に明らかなIL-4産生亢進がみられた(図2)。また、IL-4/IFN- γ 比の解析などから、MS寛解期では $CD4^+$ NKT細胞がTh2シフトを示すこと、DN NKT細胞では有意な機能的シフトはないことなどもわかった¹⁰⁾。なお、再発時には健常者に類似したパターンが観察され、 $CD4^+$ NKT細胞のTh2シフトは認められなかった。

4. MSにおけるNKT細胞の変化をどう解釈するか?

これまでは自己免疫疾患におけるNKT細胞の減少を、病態を促進する変化と解釈している論文が多

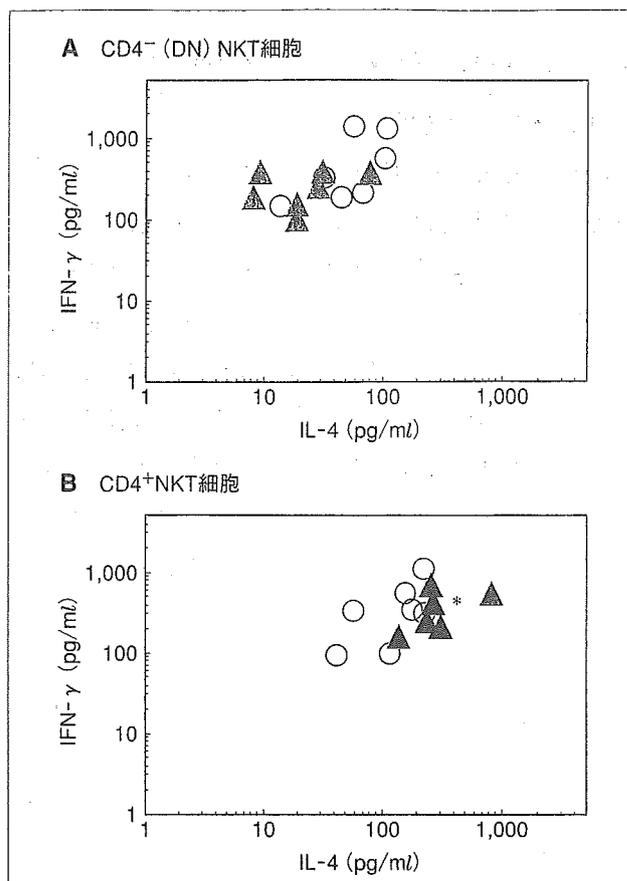


図2 MS患者(寛解期)と健常者由来のNKT細胞株のサイトカイン産生能比較

PBMCを α -GCで刺激後3週間培養。 $CD4^-$ (DN)NKT細胞と $CD4^+$ NKT細胞をセルソーターで分取し、CD3/CD28刺激後、培養上清中のIFN- γ とIL-4をELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)で測定した。

A: $CD4^-$ (DN)NKT細胞の解析結果。健常者由来のDN NKT細胞(O)に比較して、MS寛解期に樹立したDN NKT細胞(\blacktriangle)は、サイトカイン産生能が弱い。

B: $CD4^+$ NKT細胞の解析結果。健常者由来の $CD4^+$ NKT細胞(O)に比較して、MS寛解期に樹立した $CD4^+$ NKT細胞(\blacktriangle)は、IL-4産生能が強い。*は2つの \blacktriangle が同じ位置に重なっていることを示す。

い。この解釈は、NKT細胞がどれも等しく疾患抑制能をもつという前提のうえに成立するが、この前提を見直す必要のあることは上述したとおりである。MSではNKT細胞の減少が病状の安定している寛解期にみられ、しかもこれは炎症性サイトカインを産生するDN NKT細胞に限局している。DN NKT細胞のサイトカイン産生能が低下していることや、Th2にシフトした $CD4^+$ NKT細胞が残存していることもあわせて、筆者らはMSの寛解期におけるNKT細胞の変化は、病態抑制に貢献するものと考えてい

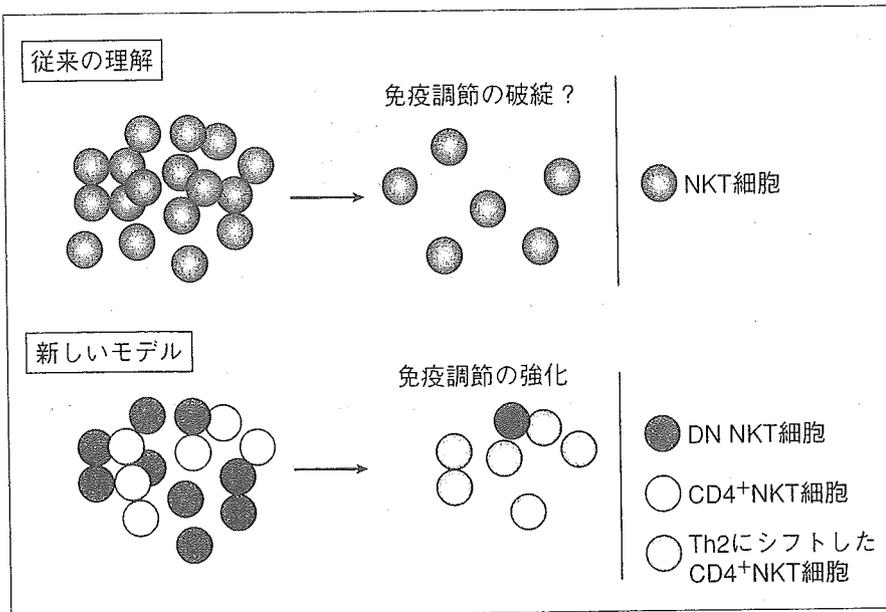


図3 MSにおけるNKT細胞の減少をどうとらえるか

従来はNKT細胞が等しく同等の免疫調節能をもつという前提で検討されてきた。この考え方では、NKT細胞の減少は免疫調節の破綻につながり、病態を悪化させることになる（上段）。しかし、新しい知見に基づき、DN NKT細胞は自己免疫病態を基本的には悪化させる細胞、 $CD4^+$ NKT細胞は自己免疫病態を制御する細胞と考えるべきである。このような理解によれば、MSにおけるNKT細胞の変化は、病態安定化に寄与するような変化ととらえられる。

る（図3）。筆者らの研究室ではNKT細胞の解析と並行してNK細胞の機能解析を行っているが、MSの寛解期に限ってNK細胞によるIL-5産生亢進が確認された¹³⁾。これらの事実から、NK細胞と $CD4^+$ NKT細胞はMSの寛解維持に貢献する調節細胞だと考えられる。

5. NKT細胞の評価方法に関する問題点

現在、臨床免疫の広い分野で、末梢血中のNKT細胞の数や機能を正確に評価することが求められている。数の評価については、抗TCR $V\alpha 24$ 抗体と $V\beta 11$ 抗体による二重染色が一般的に利用されてきた¹⁴⁾。また最近開発された $CD1d$ テトラマーも有力な方法であるが、どこでも利用できる方法とはいえない。筆者らの研究室で $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ 細胞数と α -GC/ $CD1d$ テトラマー $^+V\beta 11^+$ 細胞数を比較したところ、両パラメータには高度の相関関係があることがわかった¹⁰⁾。したがって、研究室間で研究結果に大きな乖離が出た場合に、Bendelacのようにテトラマー利用の有無で説明するよりも⁸⁾、他の因子を考えたほうがよい。解析までに要した時間、投与されている薬剤（ステロイドはNKT細胞数を増加させる¹⁵⁾）、人種的な背景などが考慮されなければならない。NKT細胞の機能評価法については、細胞内サイトカイン染色、サイトカイン分泌アッセイ、糖脂質に対する反応性などに頼っているが、改良の余地は大きい。

NKT細胞を標的とした自己免疫疾患の治療と研究の現状

動物実験ではNKT細胞の糖脂質リガンドで実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）やNODマウス糖尿病などの自己免疫疾患が抑制できるので¹⁶⁻²⁰⁾、糖脂質によるMSやIDDMの治療が実現する可能性は十分ある。筆者らは当初 α -GCによるEAEの治療実験を試みたが、治療効果がまったく得られなかったため、一時糖脂質療法の研究をあきらめた。しかし、 α -GCが無効である理由として、 α -GCがNKT細胞にIL-4の産生だけでなく、 $IFN-\gamma$ の産生も誘導することに思い当たり、NKT細胞に選択的にIL-4産生を誘導する α -GCの改変体を探した。その結果、 α -GCのスフィンゴシン鎖を短縮した化合物OCHが、NKT細胞の選択的IL-4産生を介してEAEを抑制することを見出した¹⁷⁾。

OCHはEAEだけでなく、コラーゲン誘導関節炎、NODマウスの糖尿病も抑制することがわかり（千葉、三宅ら、投稿中）、広くTh1細胞の関与する自己免疫病を制御する治療薬として期待されている。筆者らはヒト $CD4^+$ NKT細胞クローンがOCHに反応してTh2シフトすることも確認しており（荒木ら、未発表）、臨床応用への期待が高まっている。ヒトではNKT細胞数が少ないので効果がないのではな

いかという懸念もあったが、 α -GCの投与を受けた癌患者で血中サイトカインの迅速な上昇がみられたという報告は、そのような批判をしりぞけるものである。また、ヒトの自己免疫疾患ではNKT細胞が高度にTh1シフトし、糖脂質抗原刺激は病態の悪化につながるという懸念も、MSに限っては当てはまらないと思われる。なお、 α -GCによってEAEが抑制されたという報告もあるが¹⁸⁾、この実験では α -GCをアジュバントとともに投与しており、臨床応用まで考えた治療実験ではない。筆者らの検討によれば、 α -GCが抑制できるのはNODマウスの

糖尿病だけである。

NKT細胞と自己免疫をめぐる最近のトピックを通覧し、筆者らの研究室で得られたデータをもとに解説を加えた。MSですべての自己免疫疾患を代表させてよいとは考えていないが、NKT細胞がステロイド治療に反応することから、MSやIDDMのようにステロイド治療の影響が排除できる疾患のデータは貴重である。本稿がNKT細胞研究の現状と問題点を理解するうえでの一助となれば幸いである。

文献

- 1) Sumida T, Sakamoto A, Murata H et al. Selective reduction of T cells bearing invariant $V\alpha 24J\alpha Q$ antigen receptor in patients with systemic sclerosis. *J Exp Med* **182**, 1163-8 (1995)
- 2) Mieza MA, Itoh T, Cui JQ et al. Selective reduction of $V\alpha 14^+$ NK T cells associated with disease development in autoimmune-prone mice. *J Immunol* **156**, 4035-40 (1996)
- 3) Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ & Baxter AG. NKT cells : Facts, functions and fallacies. *Immunol Today* **21**, 573-83 (2000)
- 4) Wilson SB, Kent SC, Patton KT et al. Extreme Th1 bias of invariant $V\alpha 24J\alpha Q$ T cells in type 1 diabetes. *Nature* **391**, 177-81 (1999)
- 5) Illés Z, Kondo T, Newcombe J et al. Differential expression of NK T cell $V\alpha 24J\alpha Q$ invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Immunol* **164**, 4375-81 (2000)
- 6) Kojo S, Adachi Y, Keino H, Taniguchi M & Sumida T. Dysfunction of T cell receptor $AV24AJ18^+$ double-negative regulatory natural killer T cells in autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* **44**, 1127-38 (2001)
- 7) van der Vliet HJ, von Blomberg BME, Nishi N et al. Circulating $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage. *Clin Immunol* **100**, 144-8 (2001)
- 8) Lee PT, Putnam A, Benlagha K et al. Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis. *J Clin Invest* **110**, 793-800 (2002)
- 9) Oikawa Y, Shimada A, Yamada S et al. High frequency of $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ T-cells observed in type 1 diabetes. *Diabetes Care* **25**, 1818-23 (2002)
- 10) Araki M, Kondo T, Gumperz JE et al. Th2 bias of $CD4^+$ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int Immunol* **15**, 279-88 (2003)
- 11) Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T & Brenner MB. Functionally distinct subsets of $CD1d$ -restricted natural killer T cells revealed by $CD1d$ tetramer staining. *J Exp Med* **195**, 625-36 (2002)
- 12) Lee PT, Benlagha K, Teyton L & Bedelac A. Distinct functional lineages of human $V\alpha 24$ natural killer T cells. *J Exp Med* **195**, 637-41 (2002)
- 13) Takahashi K, Miyake S, Kondo T et al. Natural killer type 2 (NK2) bias in remission of multiple sclerosis. *J Clin Invest* **107**, R23-9 (2001)
- 14) Prussin C & Foster B. TCR $V\alpha 24$ and $V\beta 11$ coexpression defines a human NK1 T cell analog containing a unique Th0 subpopulation. *J Immunol* **159**, 5862-70 (1997)

- 15) 荒木 学, 三宅幸子, 山村 隆. 多発性硬化症におけるNKT細胞減少は長期ステロイド治療により補正される. 第30回日本臨床免疫学会. 東京, 2002年12月4日
- 16) Pál E, Tabira T, Kawano T et al. Costimulation-dependent modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by ligand stimulation of V α 14 NK T cells. *J Immunol* **166**, 662-8 (2001)
- 17) Miyamoto K, Miyake S & Yamamura T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing Th2 bias of natural killer T cells. *Nature* **413**, 531-4 (2001)
- 18) Singh AK, Wilson MT, Hong S et al. Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* **194**, 1801-11 (2001)
- 19) Hong S, Wilson MT, Serizawa I et al. The natural killer T-cell ligand α -galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med* **7**, 1052-6 (2001)
- 20) Sharif S, Arreaza GA, Zucker P et al. Activation of natural killer T cells by α -galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune type 1 diabetes. *Nat Med* **7**, 1057-62 (2001)



身近な例題でまなぶ

らくらく 生物統計学

著 足立堅一 日本化薬 定価 3,360円(税込)
A5判 258頁 図・表 92点

統計学の知識は医学研究に必須ですが、本当にやさしい解説本は見当たりません。本書は、高校数学程度の知識で統計の見方・考え方を理解できるよう難解な数式は避け、また問診や例題、図表を駆使して問題点を確認しながら理解できるよう工夫した初心者に格好の入門書です。

目次

母集団と標本/SD(標準偏差)とSE(標準誤差)/仮説検定と2種類の誤差(α ・ β)/標本数と統計的結論/分割表における χ^2 検定とU検定/回帰と相関/多重性に関する問題点/平均値・分散の意義/ $E(aX \pm bY \pm c)$ と $V(aX \pm bY \pm c)$ の意味と意義/数学的モデルとしての分布/検定と推定/t検定とU検定

中山書店

〒113-8666 東京都文京区白山 1-25-14 Tel.03-3813-1100 Fax.03-3816-1015
<http://www.nakayamashoten.co.jp/>

NKT細胞と自己免疫疾患

The role of NKT cells in autoimmune disease



三宅 幸子

Sachiko MIYAKE

国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部

◎NKT細胞はNKマーカーを発現するT細胞の総称であるが、その多くはT細胞受容体(TCR)α鎖に可変性のないinvariant鎖(マウスではVα14Jα281, ヒトではVα24JαQ)を発現している。Vα14NKT細胞は多型性のないCD1d分子により提示された糖脂質をリガンドとするユニークなリンパ球である。TCRを介した刺激によりIL-4, IFN-γを短時間で大量に産生することから、その免疫調節機能が注目されている。とくに自己免疫疾患においてはαガラクトシルセラミドやその誘導體であるOCHなどの糖脂質リガンドを用いて、NODマウスにおける糖尿病や実験的自己免疫性脳脊髄炎、コラーゲン関節炎を抑制できることが報告され、自己免疫疾患の新しい治療方向として期待されている。



Key word : NKT細胞, 自己免疫疾患, 糖脂質リガンド, サイトカイン

NKT細胞とは

NKT細胞はNKマーカーを有するT細胞の総称であり、いくつかのサブポピュレーションがあることが知られている。そのなかで、T細胞受容体(TCR)α鎖に可変性のないinvariant鎖(マウスではVα14Jα281, ヒトではVα24JαQ)を発現する細胞の解析がもっとも進んでおり、自己免疫との関連も研究されているので、本稿ではVα14(ヒトではVα24)NKT細胞について概説する¹⁻³⁾。

Vα14NKT細胞は限られたVβ遺伝子(マウスではVβ8.2, Vβ7, Vβ2, ヒトではVβ11)と会合するため、TCRの可変性が乏しい。また、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスI類似のCD1d分子に提示された糖脂質を抗原として認識するのが大きな特徴である。CD1分子はβ2ミクログロブリンと非共有結合したヘテロ二量体として細胞表面に発現し、MHC class I分子に類似している(図1)。CD1ファミリーにはヒトではグループ1-CD1(CD1a, b, c)とグループ2-CD1(CD1d)が知られているが、マウスではCD1d分子のみが存在する。CD1分子はMHC分子と異なり多様性がないため、同一種内では共通である。

CD1d分子は結晶構造解析ではMHC class I分子に類似するが、抗原結合溝はきわめて疎水性である。抗原結合溝が疎水性であること、NKT細胞の

サイド
メモ

自然免疫と獲得免疫

自然免疫は好中球、マクロファージを中心とする感染初期に作用する免疫機構である。細菌の菌体成分などのような共通の分子パターンをtoll-like receptorなどを用いて認識する。獲得免疫とはリンパ球を中心とした反応で、やや遅れて起こる。獲得免疫ではさまざまな抗原に特異的に反応し、同じ抗原にさらされると反応性は徐々に精度を増し、より早くより効果的な反応を起こすことができる。多様な抗原を認識し、かつ精度を高められるように、抗原受容体は遺伝子再構成を起こす。以上のように、獲得免疫と自然免疫における重要な差は特異性と記憶であるといえる。NKT細胞は、抗原受容体の半可変性に加え、組織に多数存在してクローン性の増殖を必要とせずすぐに反応を開始できる、活性化により多種類のサイトカインを大量に放出できるなど、自然免疫系と獲得免疫系の橋渡しとして重要な細胞である。

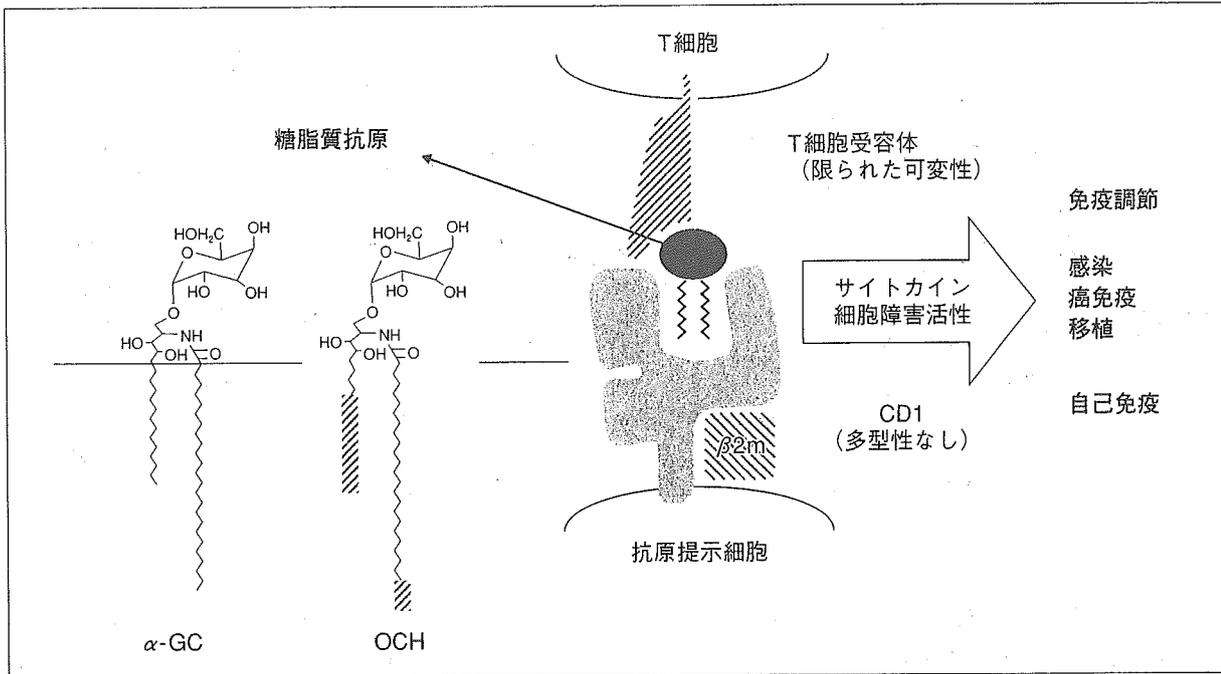


図 1 NKT 細胞とその合成リガンド

Vα14NKT 細胞は半可変性 T 細胞受容体を発現し、多型性のない CD1 分子に提示される糖脂質を抗原として認識する。活性化に伴い、速やかにサイトカインを産生し、さまざまな調節に関与する。

発生が抗原関連トランスポーター(TAP)非依存性であること、他の CD1 ファミリー分子が結核菌細胞壁の構成脂質であるミコール酸やレプラ菌の細胞壁糖脂質であるリポアラビノマンナン(LAM)を抗原提示することなどから、CD1d に抗原提示を受ける NKT 細胞も蛋白ではなく、糖脂質をリガンドとして認識すると考えられた。

直接的な証明としては、NKT 細胞のリガンドとして谷口らが海綿の成分である α ガラクトシルセラミド(α-GC)が NKT 細胞のリガンドとなることを発見したことである⁴⁾。α-GC は哺乳類の体内に存在することは証明されていないので、NKT 細胞の生体内での抗原がなにかについてはまだ不明な点が多い。ヒトの臍帯血中の NKT 細胞や germ free マウスの NKT 細胞もすでにメモリーマーカーが陽性であることから、何らかの自己抗原を認識しているのではないかと考えられている。

機能的な特徴としては、TCR を介した刺激により IL-4, IFN-γ を含む多くのサイトカインを短時間で大量に産生することから、感染症、癌免疫、移植などさまざまな場面で自然免疫と獲得免疫をつなぐ細胞としてその免疫調節機能が注目されて

いる(「サイドメモ」参照)。とくに自己免疫疾患においては α-GC やその誘導体である OCH(図 1)などの糖脂質抗原を用いて、NOD マウスにおける糖尿病、実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE)、コラーゲン関節炎(CIA)などの実験的自己免疫疾患を抑制できることが報告され、自己免疫疾患の新しい治療方向として期待されている⁵⁻⁸⁾。

本稿では自己免疫疾患動物モデルにおける NKT 細胞の関与、糖脂質による治療の試みについて紹介し、ヒトの自己免疫疾患における NKT 細胞の関与についても概説する。

NKT細胞と自己免疫疾患モデル

1. 実験的自己免疫性脳脊髄炎

EAE は難治性神経疾患である多発性硬化症の動物モデルで、Th1 細胞が介在する自己免疫病である。EAE における NKT 細胞の役割は、CD1 ノックアウトマウスの解析では軽症化、不変、重症化と報告が分かれている。自験結果によると、B6 マウスにおける MOG 誘導の EAE において CD1 あるいは Jα281 ノックアウトマウスでは不変あるいは軽度重症化する。糖脂質抗原による NKT 細胞

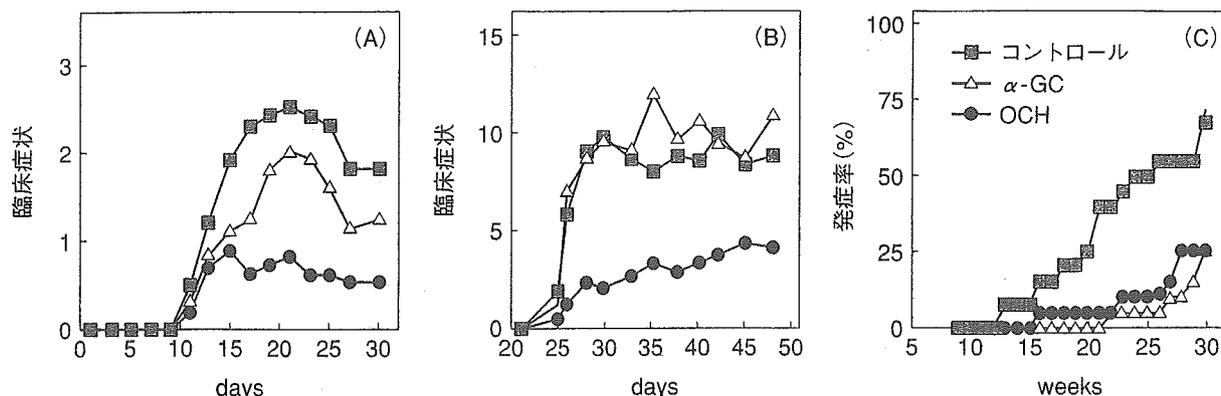


図 2 合成糖脂質による自己免疫疾患モデル抑制効果

A: EAE(実験的自己免疫性脳脊髄炎), B: CIA(コラーゲン関節炎), C: T1D(NOD マウスにおける糖尿病).
 OCH は EAE, CIA, T1D などの Th1 優位な自己免疫疾患モデルの病態を抑制する.

活性化については, NKT 細胞の代表的な糖脂質リガンドである α -GC は自験データでは EAE を抑制しなかった. その後, マウスの系統によって差はあるが, α -GC も EAE を抑制するという報告もある. 自験データではサイトカインノックアウトマウスなどを使った一連の解析の結果, α -GC が EAE に無効である理由は NKT 細胞に Th1 抑制的な IL-4 だけでなく Th1 促進的な IFN- γ の産生を促すためであると考えられた.

そこで, NKT 細胞に IL-4 だけを産生させることができれば, EAE は抑制できると考え, NKT 細胞に選択的に IL-4 産生を促して EAE を抑制するような糖脂質を探索し, α -GC のスフィンゴシン鎖の短縮体である OCH がこのような性質をもつことがわかった^{6,9)}. その選択的な IL-4 誘導能に一致して, OCH を EAE 誘導時に経口投与すると EAE は強く抑制された(図 2). また, OCH 投与群では免疫源である MOG ペプチド₃₅₋₅₅ に対する抗体のアイソタイプを測定すると, 抗 MOG₃₅₋₅₅IgG1 が選択的に上昇しており, MOG₃₅₋₅₅ に対する自己免疫応答が OCH により Th2 に偏倚していた. 抗 IL-4 抗体による中和実験と IL-4 ノックアウトマウスを使った実験の結果, OCH と抗 IL-4 抗体を同時投与すると EAE の抑制はみられなくなり, IL-4 ノックアウトマウスでは OCH の EAE 抑制効果はみられず, OCH の EAE 抑制には IL-4 が重要な役割を果たすことが明らかになった⁶⁾. また, サルファタイトの投与では, CD1 拘束性 α -GC 非反応性 T 細胞を刺激して EAE が

抑制されたという報告がなされ¹⁰⁾, EAE では α -GC による抑制効果については報告が一致しないが, OCH などのリガンドを使って NKT 細胞を適切に活性化することにより, EAE は抑制される.

2. NODマウスにおける糖尿病

1型糖尿病(T1D)の自然発症モデルとして汎用されている NOD マウスでは NKT 細胞数の減少, 活性化によるサイトカイン産生能の不良など, NKT 細胞の異常が指摘され, 自己免疫病態と NKT 細胞の関連がもっとも精力的に研究されてきた. 糖尿病との関連では NOD マウスに NKT 細胞を移入したり V α 14-J α 281 受容体遺伝子を導入して NKT 細胞を増加させると糖尿病発症を抑制することが報告された. また, CD1 をトランスジェーンにより高発現させると糖尿病が抑制されることが報告されている¹¹⁾. また, CD1 ノックアウトマウスでは糖尿病が増悪することから, NKT 細胞が糖尿病発症に抑制的に働くことが示唆された. さらに, α -GC を投与すると, 膵島抗原に対する反応が Th2 偏倚を起こし, NOD マウスにおける糖尿病発症を抑制することが報告され, NKT 細胞の適切な刺激が疾患抑制作用をもつことは明らかとなった^{7,8)}. 自験データでも, 4 週ないし 8 週から OCH または α -GC の投与を開始すると, いずれの場合においても糖尿病の発症はコントロール群に比較して著明に抑制された(図 2). また, 膵島炎も抑制されていた. α -GC による抑制機序も IL-4, IL-10 が重要で, 自己抗原反応性 T 細胞の Th2 偏倚を伴うが IL-10 の関与については異

表 1 自己免疫疾患モデルと NKT 細胞

NOD マウスにおける糖尿病
NKT 細胞の数の減少
DN-NKT 細胞移入による糖尿病抑制
V α 14J α 281 トランスジェニックマウスにおける糖尿病抑制
CD1 ノックアウトマウスにおける糖尿病悪化
α -GC による糖尿病抑制
OCH による病態抑制
CD1 トランスジェニックマウスにおける糖尿病抑制
実験的自己免疫性脳脊髄炎
OCH による病態抑制
α -GC による病態抑制
ループスモデル
MRL <i>lpr/lpr</i> , C57BL/6 <i>lpr/lpr</i> , (NZB \times NZW)F1, C3H <i>gld/gld</i> における NKT 細胞の数の減少
(NZB \times NZW)F1 における抗 CD1 抗体による病態改善
炎症性腸炎
OCH による病態抑制
α -GC による病態抑制

論もある¹²⁾.

3. 関節炎

関節リウマチの動物モデルである CIA は Th1 細胞が病態増悪に関与し, IL-4, IL-10 などの Th2 サイトカインが病態抑制につながる事が報告されている. NKT 細胞は CIA では増加する. CD1 あるいは NKT ノックアウトマウスでは臨床症状は軽快する. また, DBA1 における CIA では抗 CD1 抗体で病態が軽快する. いずれにおいてもタイプ II コラーゲンに対する抗体のアイソタイプでは IgG1/IgG2a 比がコントロール群に対して上昇していることから, 自己抗原反応性 T 細胞の Th2 偏倚が起こっていると考えられる. CIA では NOD マウスとは異なり, 自然経過においては NKT 細胞は病態悪化に関与しているようである. 異なる関節炎モデルである抗体誘導性関節炎も, CD1 ノックアウトマウス, NKT ノックアウトマウスでは症状が軽いことから, 自己抗原反応性の T 細胞の Th1/Th2 反応の変化以外にも炎症に関与して病態悪化を起こしている可能性もあることが示唆される. 糖脂質の効果としては, α -GC では CIA は抑制されなかったが, OCH 投与群では臨床スコアは強く抑制された(図 2)⁵⁾. 病理所見でも炎症細胞浸潤は著明に抑制され, 軟骨・骨病変も抑制されていた. OCH による CIA の抑制効果は, 抗 IL-4 抗体あるいは抗 IL-10 抗体の同時投与による IL-4,

あるいは IL-10 の中和によって消失したことから, OCH による CIA の抑制には IL-4, IL-10 が重要であることがわかった.

4. ループスモデル

MRL*lpr/lpr* マウスはループス様病変を自然発症するループスモデルとして知られているが, CD1d テトラマー陽性の NKT 細胞数が BALB/c, C3H, C57BL6 など他の系統のマウスと比較すると少なく, NOD マウスなどとともに, 自己免疫発症に NKT 細胞が関与することが推定されてきた. α -GC を投与すると皮膚病変は軽減するという報告があるが, 腎病変については記載がない.

NZB/WF1 マウスもループス様病変を自然発症する. このマウスでは抗 CD1d 抗体の投与で腎症発症が遅れ, また α -GC 投与によって腎症発症が早まることから, NKT 細胞は病態悪化に関与していると考えられる.

また, プリスタン投与によって誘導するループスモデルについては NKT 細胞数の減少, α -GC 投与によるサイトカイン産生が低下すること, CD1d ノックアウトに誘導すると野生型に誘導した場合と比較して病態が増悪することが報告された. ループスモデルについては NKT 細胞の役割がモデル系によってかなり異なるようである. これは, これらループスモデルが前述の EAE, T1D, CIA などの Th1 優位な臓器特異的自己免疫疾患モ

表 2 ヒト自己免疫疾患と NKT細胞

数の減少
全身性強皮症
多発性硬化症
1 型糖尿病
全身性エリテマトーデス
関節リウマチ (末梢血)
(関節組織)
Sjögren 症候群
機能変化
1 型糖尿病
全身性強皮症
全身性エリテマトーデス
関節リウマチ
Sjögren 症候群
多発性硬化症

デルと比較して病態が複雑で、サイトカインも Th1, Th2 両細胞が病態に関与するためではないかと考えられる。

いずれのモデルにおいても、NKT 細胞は病態に関与しており、治療の標的となりうる重要な細胞である。自己免疫疾患モデルと NKT 細胞についてのこれまでの報告を表 1 にまとめておく。

自己免疫疾患と NKT細胞

NKT 細胞は多発性硬化症 (MS)、1 型糖尿病、進行性全身性硬化症、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、Sjögren 症候群などの自己免疫疾患の末梢血においてその数が減少していることが報告されている^{7,8)}。また、これらの全身性自己免疫疾患では NKT 細胞の代表的な糖脂質リガンドである α -GC に対する反応が低下していることが報告されたほか、1 型糖尿病から樹立した NKT 細胞クローンは IFN- γ 産生に傾いていることなど、機能的な異常も報告されており、NKT 細胞が自己免疫疾患病態に何らかの形で関与することが推測されている (表 2)。

MS については荒木、山村らが、寛解期にある MS 患者では健常人と比較して減少しているが、再発期には NKT 細胞の減少はむしろ軽度であることを報告している¹³⁾。この際、減少しているの

は DN-NKT 細胞であり、CD4⁺NKT 細胞は寛解期、再発時ともに減少していなかった。サイトカイン産生に関しては、DN-NKT 細胞では寛解期に IL-4, IFN- γ とともに産生の低下がみられたが、CD4⁺NKT 細胞では寛解期にむしろ IL-4 の産生亢進がみられた。実際に、自己免疫疾患において NKT 細胞がどのような機能を果たしているかについては不明であるが、MS 寛解期には IFN- γ などのサイトカインを産生する DN-NKT 細胞数が減少し、DN-NKT 細胞から産生されるサイトカインも減少し、残存している CD4⁺NKT 細胞の IL-4 産生能が上がっていることを考えると、MS 寛解期において NKT 細胞は疾患を抑制するように働いていることが推定される。

おわりに

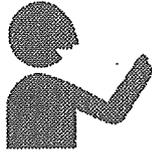
NKT 細胞は、サイトカインの産生源としてはその種類と産生量から他に類をみないほどの可能性をもつ細胞である。さらに最近では、選択的なサイトカイン産生を可能にするようなりガンドの開発が行われるようになり、今後、実際の疾患治療にも応用されていくことが期待される。

文献

- 1) Brenner, M. B. and Brigl, M. : *Ann. Rev. Immunol.*, **22** : 817-890, 2004.
- 2) Taniguchi, M. et al. : *Ann. Rev. Immunol.*, **21** : 483-513, 2003.
- 3) Kronenberg, M. and Gapin, L. : *Nat. Rev. Immunol.*, **2** : 557-568, 2002.
- 4) Kawano, T. et al. : *Science*, **278** : 1626-1629, 1997.
- 5) Chiba, A. et al. : *Arthritis. Rheum.*, **50** : 305-313, 2004.
- 6) Miyamoto, K. et al. : *Nature*, **413** : 531-534, 2001.
- 7) Wilson, S. B. and Delovitch, T. L. : *Nat. Rev. Immunol.*, **3** : 211-222, 2003.
- 8) Hammond, K. J. L. and Kronenberg, M. : *Curr. Opin. Immunol.*, **15** : 683-689, 2003.
- 9) Oki, S. et al. : *J. Clin. Invest.*, **113** : 1631-1640, 2004.
- 10) Jahng, A. et al. : *J. Exp. Med.*, **199** : 947-957, 2004.
- 11) Falcone, M. et al. : *J. Immunol.*, **172** : 5908-5916, 2004.
- 12) Mi, Q. S. et al. : *Diabetes*, **53** : 1303-1310, 2004.
- 13) Araki, M. et al. : *Int. Immunol.*, **15** : 279-288, 2003.

☆ State of arts シリーズ

- 消化器疾患 I. 胃・腸 Ver.2 B5 判 534 頁
1998 年 8 月 20 日定価 9,450 円 (本体 9,000 円+税 5%)
 - 消化器疾患 II. 肝・胆・膵 Ver.2 B5 判 552 頁
1999 年 6 月 30 日定価 9,870 円 (本体 9,400 円+税 5%)
 - 血液疾患 Ver.2 B5 判 644 頁
1998 年 6 月 25 日定価 10,500 円 (本体 10,000 円+税 5%)
 - 呼吸器疾患 2003-2005 B5 判 756 頁
2003 年 3 月 10 日定価 14,700 円 (本体 14,000 円+税 5%)
 - 腎疾患 2003-2005 B5 判 442 頁
2003 年 1 月 20 日定価 9,450 円 (本体 9,000 円+税 5%)
 - 神経疾患 B5 判 700 頁
1999 年 11 月 15 日定価 12,600 円 (本体 12,000 円+税 5%)
 - 循環器疾患 Ver.2 B5 判 842 頁
2001 年 3 月 20 日定価 12,600 円 (本体 12,000 円+税 5%)
 - 免疫疾患 Ver.2 B5 判 570 頁
2002 年 3 月 25 日定価 10,500 円 (本体 10,000 円+税 5%)
 - 糖尿病・代謝症候群 2004-2006 B5 判 824 頁
2004 年 4 月 25 日定価 15,750 円 (本体 15,000 円+税 5%)
 - 乳腺疾患 B5 判 620 頁
2004 年 6 月 10 日定価 16,800 円 (本体 16,000 円+税 5%)
 - サイトカイン B5 判 406 頁
2004 年 10 月 5 日定価 9,870 円 (本体 9,400 円+税 5%)
- ☆
- CD 抗原ハンドブック B5 判 728 頁
1999 年 9 月 20 日定価 14,700 円 (本体 14,000 円+税 5%)
 - ヒスタミン研究の最近の進歩 B5 判 114 頁
2000 年 7 月 5 日 定価 3,990 円 (本体 3,800 円+税 5%)
 - 代替医療のいま B5 判 182 頁
2000 年 10 月 15 日定価 3,990 円 (本体 3,800 円+税 5%)
 - 冠血管リモデリング B5 判 178 頁
2000 年 10 月 25 日定価 5,040 円 (本体 4,800 円+税 5%)
 - インфекションコントロールチーム B5 判 120 頁
2000 年 12 月 20 日定価 2,310 円 (本体 2,200 円+税 5%)
 - 7 回膜貫通型受容体研究の新展開 B5 判 278 頁
2001 年 3 月 15 日定価 6,090 円 (本体 5,800 円+税 5%)
 - 未病の医学 B5 判 128 頁
2001 年 9 月 20 日定価 3,570 円 (本体 3,400 円+税 5%)
 - 動脈瘤と動脈解離の最前線 B5 判 186 頁
2001 年 9 月 25 日定価 5,460 円 (本体 5,200 円+税 5%)
 - 酸化ストレス—フリーラジカル医学生物学の最前線 B5 判 326 頁
2001 年 9 月 30 日定価 7,980 円 (本体 7,600 円+税 5%)
 - 脳血管障害—臨床と研究の最前線 B5 判 258 頁
2001 年 10 月 25 日定価 6,090 円 (本体 5,800 円+税 5%)
 - 21 世紀の神経免疫学—展望 B5 判 208 頁
2001 年 11 月 30 日定価 5,460 円 (本体 5,200 円+税 5%)
 - テレパソロジー 2002—実用化と発展をめざして B5 判 130 頁
2002 年 3 月 15 日定価 3,570 円 (本体 3,400 円+税 5%)
 - 輸血の現状と課題 B5 判 256 頁
2002 年 5 月 1 日 定価 6,090 円 (本体 5,800 円+税 5%)
 - 高脂血症と動脈硬化 B5 判 278 頁
2002 年 7 月 15 日定価 8,400 円 (本体 8,000 円+税 5%)
 - Radiosurgery の最前線—現況と展望 B5 判 132 頁
2002 年 9 月 15 日定価 5,040 円 (本体 4,800 円+税 5%)
 - 動物界における免疫系の進化 B5 判 118 頁
2002 年 12 月 1 日定価 3,570 円 (本体 3,400 円+税 5%)
 - 現代西洋医学からみた東洋医学 B5 判 124 頁
2003 年 5 月 20 日定価 3,570 円 (本体 3,400 円+税 5%)
 - 医療リスクマネジメントに向けて B5 判 170 頁
2003 年 8 月 5 日 定価 3,780 円 (本体 3,600 円+税 5%)
 - 疾患モデル動物—病因解析での役割と限界 B5 判 130 頁
2004 年 1 月 25 日定価 3,570 円 (本体 3,400 円+税 5%)
 - ARDS のすべて B5 判 378 頁
2004 年 3 月 25 日定価 8,400 円 (本体 8,000 円+税 5%)
 - 超音波医学最前線—新技術と臨床応用 B5 判 242 頁
2004 年 5 月 10 日定価 7,350 円 (本体 7,000 円+税 5%)
- ☆第 1 土曜特集別冊化シリーズ
- インターベンショナルラジオロジー (IVR) B5 判 86 頁
2000 年 11 月 20 日定価 2,940 円 (本体 2,800 円+税 5%)
 - 老化のメカニズムを探る B5 判 106 頁
2001 年 1 月 30 日定価 2,940 円 (本体 2,800 円+税 5%)
 - 糸球体腎炎の発症と治療 B5 判 126 頁
2001 年 7 月 5 日 定価 2,940 円 (本体 2,800 円+税 5%)
 - 虚血性心疾患—21 世紀へ向けての新しいアプローチ B5 判 142 頁
2001 年 8 月 30 日定価 3,150 円 (本体 3,000 円+税 5%)
 - 脳梗塞超急性期—BrainAttack 時代の診断と治療 B5 判 126 頁
2001 年 10 月 15 日定価 3,150 円 (本体 3,000 円+税 5%)
 - CD 抗原と疾患 B5 判 106 頁
2001 年 12 月 5 日定価 3,150 円 (本体 3,000 円+税 5%)
 - アレルギーの分子医学的究明と克服 B5 判 150 頁
2002 年 2 月 20 日定価 3,150 円 (本体 3,000 円+税 5%)
 - 血管新生研究の新しい展開 B5 判 122 頁
2002 年 8 月 25 日定価 3,150 円 (本体 3,000 円+税 5%)
 - 再生医学と組織工学—現状と今後の課題 B5 判 110 頁
2002 年 9 月 5 日 定価 3,150 円 (本体 3,000 円+税 5%)
 - 痛みとその制御機構—分子メカニズムと治療の最先端 B5 判 140 頁
2002 年 11 月 1 日定価 3,150 円 (本体 3,000 円+税 5%)
 - 自殺の病理と実態—救急の現場から B5 判 106 頁
2003 年 1 月 10 日定価 3,150 円 (本体 3,000 円+税 5%)
 - COPD (慢性閉塞性肺疾患) B5 判 138 頁
2003 年 2 月 25 日定価 3,150 円 (本体 3,000 円+税 5%)
 - 造血器腫瘍のあらたな治療戦略 B5 判 108 頁
2003 年 7 月 1 日 定価 3,150 円 (本体 3,000 円+税 5%)
 - ウイルス性肝炎の現況と展望 B5 判 148 頁
2003 年 7 月 25 日定価 3,570 円 (本体 3,400 円+税 5%)
 - 細胞免疫療法の現状 B5 判 110 頁
2003 年 9 月 5 日 定価 3,150 円 (本体 3,000 円+税 5%)
 - 膠原病—診断・治療の進歩 B5 判 114 頁
2003 年 10 月 20 日定価 3,150 円 (本体 3,000 円+税 5%)
 - 慢性疼痛—病態と治療法 B5 判 108 頁
2003 年 11 月 25 日定価 3,150 円 (本体 3,000 円+税 5%)
 - NO と病態 B5 判 156 頁
2004 年 5 月 25 日定価 3,360 円 (本体 3,200 円+税 5%)
 - DIC の新展開 B5 判 144 頁
2004 年 7 月 25 日定価 3,360 円 (本体 3,200 円+税 5%)
 - NASH (非アルコール性脂肪性肝炎) B5 判 86 頁
2004 年 10 月 15 日定価 3,150 円 (本体 3,000 円+税 5%)



話 題

ニューロペプチド Y と免疫制御*

山 村 隆**

Key Words : neuropeptide Y(NPY), EAE, immunoregulation, Th1/Th2

はじめに

免疫疾患は、ストレスや精神状態の影響を受ける。たとえば、精神的ストレスでアレルギー疾患が増悪することは日常的に経験することであるが、その生物学的な背景について明らかにされていることは少ない。その理由として、このような免疫学と神経科学の接点に存在する問題は、それを解決する手がかりが少なく、研究者の数も少ないことがあげられるかもしれない。しかし、免疫系と神経系が共通の分子を用いていることや、両システムのクロストーク (neuro-immune crosstalk) の実態が徐々に明らかになり、内分泌系も含めて、生体調節機構(神経・免疫・内分泌ネットワーク : neuro-immune-endocrine network) を包括的に扱うような研究が重要になってきた。神経系による免疫制御については、交感神経がアドレナリン受容体を介して免疫反応を制御する事実が以前から知られている^{1)~3)}。しかし、交感神経末端からカテコラミンとともに放出される co-transmitter であるニューロペプチド Y (neuropeptide Y ; NPY) が、カテコラミンと協調して免疫反応を制御することが明らかになり、神経免疫制御にかかわる分子のひとつとして新しい研究対象になっている⁴⁾。本稿では、NPY の免疫制御作用に関する最近の知見を紹介する。

ニューロペプチド Y

ニューロペプチド Y (NPY) は 36 個のアミノ酸からなるポリペプチドで、Tatemoto らによって 1982 年に豚の脳から発見された⁵⁾。NPY 受容体は 7 回膜貫通型の G 蛋白質共役型レセプターで、マウスでは機能的なレセプターとして Y1, Y2, Y4, Y5, Y6 の 5 種類のサブタイプ、ヒトでは Y6 を除いた 4 種類のサブタイプが存在する。共通の受容体を利用するファミリー分子には、膵臓で産生される pancreatic polypeptide (PP) と小腸で分泌される peptide YY (PYY) がある。NPY は中枢神経系内でもっとも豊富に存在する神経ペプチドであり、その中枢神経系における作用はきわめて多彩である。とくに食欲亢進作用は顕著であるが、情動反応の制御、血管収縮、神経活動性の制御などにも関係する。近年では、NPY や NPY 受容体を欠損するノックアウトマウスが多数作製され、受容体サブタイプそれぞれの機能に関する解析が進んでいる⁶⁾。

NPY の分布は中枢神経に限局せず、末梢の節後交感神経 (postganglionic sympathetic fiber) 末端のシナプス小胞にも豊富に存在する。その大部分はノルエピネフリン (norepinephrine ; NE) と同じ小胞に含まれるが、NPY のみを含む小胞もある (図 1)。交感神経が活性化すると NPY は NE とともに分泌され⁷⁾、NE の co-transmitter として交感神経活動の変化を微妙に調整する。

* Neuropeptide Y as an immunomodulatory molecule.

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

交感神経による免疫系の調節

交感神経末端は一次免疫臓器(胸腺), および二次リンパ臓器(リンパ節, 脾臓)に広く分布している. 過去20年間の研究により, 交感神経が免疫系を制御する証拠が集積してきた. とくに6-hydroxydopamine (6-OHDA)の体内投与によって, ラットやマウスの交感神経終末NEを枯渇させる方法(化学的交感神経切除, chemical sympathectomy; CSE)は, 交感神経が免疫系に及ぼす役割の解明に貢献してきた¹³⁾. たとえば, 多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)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)は, CSEによって増悪する¹³⁾. また関節リウマチのモデルであるコラーゲン誘導関節炎も, 同様にCSEで悪化する⁹⁾. EAEやコラーゲン誘導関節炎は, Th1細胞の介在する動物モデルであり, CSEの実験結果は交感神経系がTh1細胞の抑制に関与することを示唆している. しかし, CSEによって逆に関節炎が軽症化したという報告もあり, 交感神経が常にTh1応答を抑制するとは限らない. またわれわれは, IL-4ノックアウトマウスに誘導したEAEがCSEによって軽症化することを報告している⁸⁾. 実験結果が乖離する理由は不明であるが, T細胞免疫応答の誘導における動物の系統差や, 感作条件の違いなどで説明できるかもしれない.

カテコラミンと免疫調節

リンパ球やマクロファージの機能は, カテコラミンによるアドレナリン β_2 受容体(β_2R)の刺激により調節を受ける. たとえば, β_2R を特異的に活性化するsalbutamolは, モノサイトやマクロファージのIL-12産生を抑制して, 免疫応答をTh1からTh2に偏倚させる¹⁰⁾¹¹⁾. Th1細胞を介する自己免疫疾患MSに対するsalbutamol短期投与試験では, モノサイトのIL-12産生抑制が確認されている¹¹⁾. 関節炎モデルにおいても, salbutamolがマクロファージや樹状細胞のIL-12産生抑制を介して治療効果を示すが¹²⁾, 長期投与では, β_2R 受容体発現レベルの低下のために治療効果は期待できない. なお, salbutamolには, 経口寛容(oral

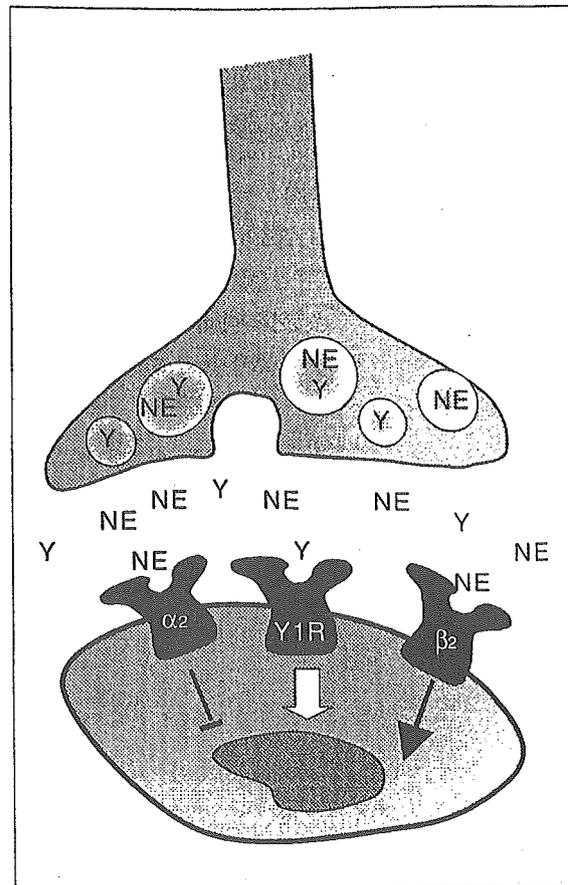


図1 交感神経—免疫制御におけるノルエピネフリンとNPYの役割

交感神経終末にはノルエピネフリン(NE)とNPY(Y)を含有する小胞, あるいはNPYのみを含む小胞があり, 神経活動に伴って放出され, 近傍の免疫細胞(ここではマクロファージ)に作用する. 低濃度のNEは α_2 受容体を介して抑制性シグナルを入れ, マクロファージのIL-6産生を抑制する¹⁶⁾. しかし, 高濃度のNEは β_2 受容体を介してIL-6産生に促進的なシグナルを入れる. NPYによるY1受容体を介したシグナルは, α_2 受容体の抑制シグナル, β_2 受容体の促進シグナル, それぞれを増強させるco-transmitterとして働く.

(文献¹⁵⁾¹⁶⁾より引用改変)

tolerance)の誘導を促進する作用も報告されている¹³⁾. β_2R は活性化Th1細胞には発現し, 活性化Th2細胞には発現しないという論文もあり¹⁴⁾, カテコラミンは状況によってはTh1細胞のみを抑制し, Th1/Th2バランスをTh2に偏倚させることが推測される.

NPYによる自然免疫制御

NPYは自然免疫(innate immunity)と獲得免疫(acquired immunity)の両方に影響を与えることが報告されている. NPYによる自然免疫系の調