

- Cell Signaling and its Clinical Application. Marcel Dekker, New York, 1999, p.328.
- 2) Matsui, M. et al. : *Dev. Biol.*, **178** : 179-185, 1996.
 - 3) Takagi, Y. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96** : 4131-4136, 1999.
 - 4) Mitsui, A. et al. : *Antioxid Redox Signal*, **4** : 693-696, 2002.
 - 5) Andersen, J. K. : *Nat. Med.*, **10**(Suppl.) : S18-25, 2004.
 - 6) Klaunig, J. E. and Kamendulis, L. M. : *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **44** : 239-267, 2004.
 - 7) Riley, P. A. : *Int. J. Radiat. Biol.*, **65** : 27-33, 1994.
 - 8) Trosko, J. E. and Inoue, T. : *Stem Cells*, **15**(Suppl. 2) : 59-67, 1997.
 - 9) Muller, H. J. : *Science*, **66** : 84-87, 1927.
 - 10) Cronkite, E. P. and Carsten, A. L. : Proc. The Sixth Int. Congr. of Radiat. Res. (ed. by Misono, K. et al.). Jpn. Assoc. Radiat. Res. Toppan Printing, Tokyo, 1979, pp. 648-656.
 - 11) Shuin, T. et al. : *Cancer Res*, **46** : 5302-5311, 1986.
 - 12) Kurokawa, Y. et al. : *Gann*, **73** : 335-338, 1982.
 - 13) Kurokawa, Y. et al. : *J. Natl. Cancer Inst.*, **77** : 977-982, 1986.
 - 14) Kurokawa, Y. et al. : *Environ. Health Perspect.*, **87** : 309-335, 1990.
 - 15) Ohgaki, H. et al. : *Princess Takamatsu Symp*, **16** : 97-105, 1985.
 - 16) Hirose, M. et al. : *Food. Chem. Toxicol.*, **37** : 985-992, 1999.
 - 17) Murata, M. et al. : *Jpn. J. Cancer Res.*, **90** : 268-275, 1999.
 - 18) MacCay, C. M. et al. : *J. Nutr.*, **10** : 63-79, 1935.
 - 19) Yu, B. P. et al. : *J. Gerontol.*, **37** : 130-141, 1982.
 - 20) Yoshida, K. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94** : 2615-2619, 1997.
 - 21) Yoshida, K. et al. : *IARC. Sci. Publ.*, **156** : 553-555, 2002.
 - 22) Yoshida, K. et al. : Radiation and homeostasis. In : Proceedings of the International Symposium of Radiation and Homeostasis (ed. by Sugahara, T. et al.). Elsevier, Oxford, 2002 pp.455-458.
 - 23) Merry, B. J. : *Aging Cell*, **3** : 7-12, 2004.
 - 24) Sai, K. et al. : *Food Chem. Toxicol.*, **36** : 1043-1051, 1998.
 - 25) Sai, K. et al. : *Cancer Lett.*, **173** : 163-174, 2001.
 - 26) Sai, K. et al. : *Carcinogenesis*, **21** : 1671-1676, 2000.
 - 27) Sai, K. : 放射線科学, **42**(6) : 113-119, 1999.
 - 28) Masutani, H. et al. : *J. Toxicol. Sci.*, **26** : 199, 2001.
 - 29) Adachi, J. et al. : *J. Biol. Chem.*, **276** : 31475-31478, 2001.
 - 30) Matsui, S. : 未発表データ.
 - 31) Yoon, B. I. et al. : *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **41** : 232-236, 2001.

* * *

はじめに

Introduction



井上 達

Tohru INOUE

国立医薬品食品衛生研究所

解読された全ゲノムの塩基配列を利用して明らかにしうることは、ゲノム構造に拘束された決定論的な生命の枠組みと、遺伝子発現の可塑性によって展開する確率論的な生命の多様性である。前者ではミレニウム計画などで傾注された薬物代謝における SNPs の発見やテーラーメイド創薬戦略の研究が進んだ一方、後者でいまゲノムと環境の相互作用によって展開される生物の多様なエピジェネティクスとしての環境生体応答学がおもしろくなっている¹⁾。トキシコゲノミクス²⁾はどちらかといえば後者に属し、それはトランスクリプトミクスやプロテオミクス、インフォマティクスなどの総体によって描きだされるトキシコパノミクス (toxicopanomics) とでもよぶべき新領域である。

トキシコパノミクスは物質と生体の応答学であるが、生体側からみる手法をトランスクリプトミクスと考えれば、生体内生成物の側からみる解析手法は主としてプロテオミクスによる。前者では DNA チップなど的高密度集積アレイ解析を用い、後者では GC マスなどの蛋白定量解析手技を適用する。ちなみに代謝に注目すると、前者は、メタボノミクスの手法、後者では代謝物に焦点をあてたメタボロミクスを中心に探査することになる。

この世界ではゲノム科学が取り組んできた帰納的解析にとどまらず、遺伝子発現や蛋白発現をフェノタイプとして用いることによって演繹的に後生的な予測が可能となる。オミクス領域を積極的にそうした予測のツールに発展させようとする点に、ここで取り上げるトキシコパノミクスの、決定論的な応用としての“マイクロアレイ診断”と異なった特徴がある。遺伝子発現情報は塩基配列情報にとどまり転写の経路や蛋白がフェノタイプとして持つ情報の多様性 (complexity) をカバーしないから予測は限定的になる。エピジェネティクスに対する予測能は未知である。そうした限界にもかかわらずこのものの生命の安全性や環境科学へ果たす役割には大きな期待が寄せられている。

文献

- 1) 井上 達：毒性学の現状と展望—あたらしいバイオサイエンスとしての生体異物応答科学。科学, 74(1) : 18-23, 2004.
- 2) Inoue, T. and Pennie, W. D. (ed.) : Toxicogenomics. Springer-Verlag, Tokyo, 2003, pp.1-11.

医薬品の毒性評価、その未来 —実験動物と動物試験の展望—

井上 達 国立医薬品食品衛生研究所

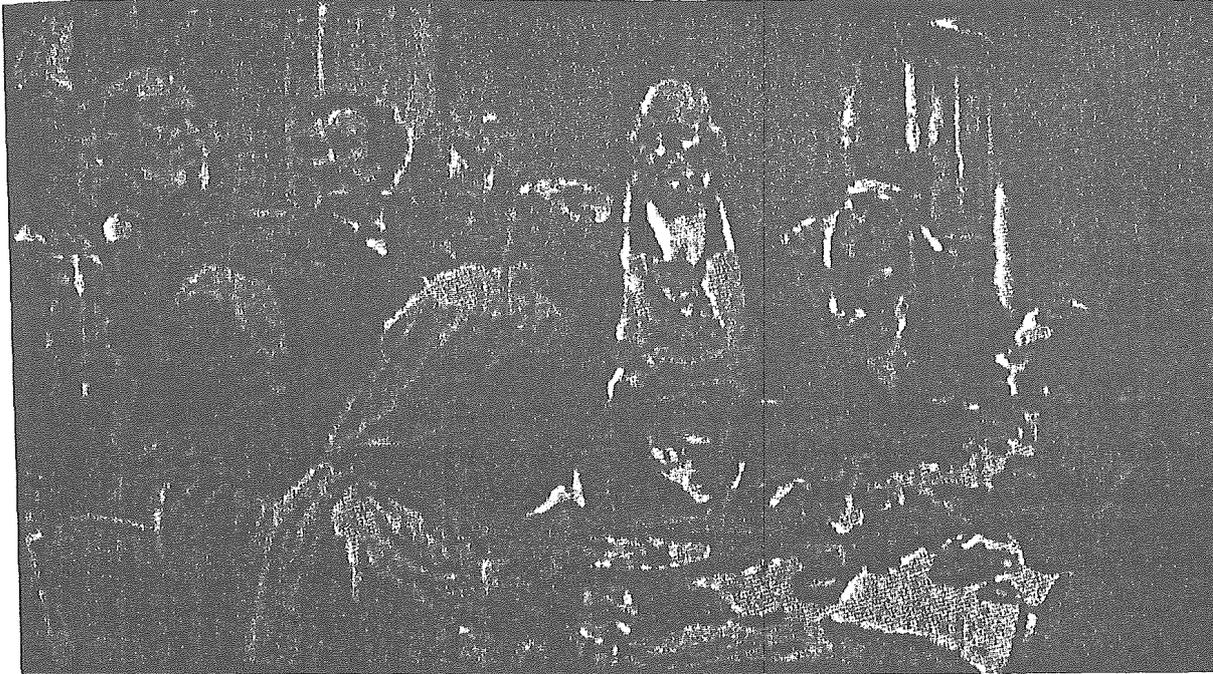


図1 実験示説を行うクロード・ベルナル（中央、正面を向いている人物）と、弟子たち（平田実「図説科学・技術の歴史 下」、朝倉書店、1985年より）

はじめに

前 臨床試験、あるいは非臨床試験とよばれる医薬品の毒性評価試験は、単回投与、反復投与、遺伝毒性、がん原性、および生殖発生といったコア試験、ならびにトキシコキネティクス、皮膚感作性、皮膚光感作性、といった特殊毒性試験など多くの試験バッテリーから構成され、多数の実験動物が用いられる^{1,2)}。

国会で「動物の愛護および管理に関する法律」³⁾が見直されようとしている折りでもあり、一般の人々は必ずしも事柄を筋道を立てて考えてくれる訳ではないから、これは人々の眼に好感をもっては迎えられない。しかしそれら動物実験の内、遺伝毒性試験やがん原性試験のように、その名称そのものが目的を顕す試験はそれとして、いわゆる毒性試験が前臨床試験のスタートライ

ンで求められる肝心な情報は、当該の薬物を治療に際してどの程度の用量まで投与し得るかという点にある。これ以上投与すると死を招くというような危険性の限度を知ることなしにヒトへの治療に用いることは道義的に無理だからである。

そう考えると、動物実験はなくせるはずがないという結論がアツという間に出てきて、議論はすぐさま、せめて少しでも使用動物を減らすワケにはゆかないかという展開になってくる。事実今、動物愛護団体が動物実験に求めている努力目標は、動物実験の縮少(reduction)、改良(refinement)、そして代替(replacement)、すなわち“3R”である。

今日、本邦で用いられている研究用の動物などすべてを含んだ実験動物の年間使用数量は、ラットが124万匹、マウスが280万匹であり⁴⁾、この数量は膨

本稿は、2004年11月25日日本学会会議第27回トキシコロジー研究連絡委員会シンポジウムにおいて「動物実験と科学」と題して行った講演の骨子を元に趣旨をまとめたものである。

大というべきかもしれない。しかしラットの場合、1995年は209万匹、1998年は153万匹と発表されているので、これは1995年に比べれば、60%という激減であることも事実である。マウスに至っては、1995年の668万匹の何と42%である。

実はこれは驚くにはあたらないのであって、この背景には、科学史上まれにみる激動的な研究の質の変化が進行している。ここ10~15年の実験動物の利用法は大きな変化を遂げている。それがそのまま現段階では使用動物の単純な縮小につながっているとは思われないが、闇雲に動物に何かの処置を施して観察をするといった研究で得られるものの成果の質が今見直されつつある。つまり、ここでは、実験動物の使用数は科学の発展段階に応じて増減するということが見事に示唆されているのである。

先の動物数の内、毒性試験に用いられた動物数を推定してみると、2001年は、ラットが66万匹、マウスが112万匹である。毒性試験に用いられた動物数については変遷の詳細が手許にないが、こちらの方では、いわゆる医薬品の各国間相互承認の国際協調会議(ICH)⁶⁾の進行に伴って不必要になっている試験がかなりある。それがどの程度この間の動物数の減少に貢献しているかは興味がある。ともかくこのように減少しつつある動物実験であるが、さらに将来を見据えたとき、未来の動物実験はどうなってゆくのであろうか。これについては、創薬のための最低限の動物実験はなくすことは不可能であり、未来永劫続けるを得ない、という考え方が意外に多い。

こういう質問がある。「動物実験は、たとえば西暦3000年、つまり今から千年後にも依然として続けられているとあなたは思いますか?」。このような質問に対して、yesと考えるヒトからは、

「千年後とはいえ、あらかじめ前臨床動物実験が行われていないようなriskyなおくすりをあなたはご自分のお子さんに飲ませますか?」と反問が返ってくる。千年たっても今日のように次々と新薬の開発を続けなければならないほど、所詮、究極のよく効くくすりなどというものは創れるはずがないという科学の未来観は、そのまま生命の神秘に対する畏敬の念に発した敬虔な考え方とも考えられるが、もう1つ、病気の治療という応用科学の終局を、科学の発展に終点がないという命題を語る際の「科学一般」と混同している向きもある。たしかに、先天性の疾患やがんなどに対して限られた努力あるのみで、本源的な解決には至り得ないものとも考えるのはやむを得ないことかもしれない。しかも、病気の中には時代と環境に即して新たに生まれてくるものも少なくないし、現状をみる限りでは、解決したものより残されている難題と難治の病の方が多し。しかし、今アニリンの合成に起源を求めらるならば、これまでの目覚ましい発展は近代のわずか170年足らずの間の成果にすぎない。それは究極のゴールからみるならばささやかなものに過ぎないかも知れないが、この間にはもはや治療方針の根幹の確立した病気もあれば、事実上消滅してしまったものさえたくさんある。現状の動きがいかに萌芽的にもせよ、将来、科学の発展とともに、実験動物がその必要性を失ってゆく運命にあることは確かなことなのだと思う。あえて動物福祉とか、動物愛護とかといった社会運動の助けを借りることなく、科学の発展そのものの結果として…。問題はそれがどのような道筋を歩んでゆくのかにある。

本稿では、動物実験が歴史に登場してから今日に至るまでの流れを通覧し、これからの医薬品の毒性評価などにかかわる動物利用の行方を、クロード・

ベルナル、ブルース・エームズ、および、パトリック・ブラウンの3人を取り上げて考えてみたい。

クロード・ベルナル： 実験医学の生みの親

動 物実験を研究に導入することの意義を最初に学説として主張したのは、クロード・ベルナル(Claude Bernard, 1813-1878年)であると伝えられている。ベルナルは、「実験医学序説」を著し、動物実験の生みの親として知られる⁶⁾。岩波文庫版実験医学序説によれば、ベルナルは1813年に東部フランスのサン・ジュリアンに生まれ、21歳の時、劇作家を志してパリに出て後、文芸批評家の忠告に従って医学の道に進んだ。生理学者マジャンディの弟子となった後、胃液に関する研究で学位を得て、膵液の消化作用の研究によりマジャンディの後任として、コレージュ・ド・フランスの教授になっている。

実験動物を用いることによる予知力と再現性のある生物学の発展はベルナルによって始まった。これは自然や病態に対して、静的な観察結果の記載や解釈をもって主体としたそれまでの博物学や記載科学に対して、生物に直接働きかけ、その反応から生体の仕組みや病態を証明しようとする“近代科学思想”の幕開けであり、今日的な眼で見ると、それはトキシコロジーの萌芽そのものをも意味していた(図1)⁷⁾。だから彼は「観察家」という名称を、自らは変化させることなく、したがって自然が示すままに蒐集した現象の研究に単純または複雑な探究方法を応用する人に与え、[「実験家」という名称を、自然現象を変化させたり、何らかの目的をもってそれらを変化させ、自然が彼に提供しなかったような環境や条件において自然現象を出現させるために単純または複雑な探究方法を応用する

人に与える⁸⁾として、両者を截然と区別している。

ベルナルは肝臓がグリコーゲンを貯蔵する機能を持ち、これによって糖代謝の調節に重要な役割を果たしていることを発見した(1843-1857年)。これは「器官の内部分泌」という概念の基礎となり、今日の糖尿病の概念が形成されるにあたってきわめて重要なものとなった。続いて膵液についての彼の研究(1849-1856年)では、消化の生理学と病理学にも新発見をもたらした。

ベルナルによる第3の発見として知られる研究は、血管運動神経機構についてである。これは正常生理学にとって重要であるだけでなく、病理学においても適用される面が多い。たとえば、能動性充血やたぶん狭心症の理解にも重要であるし、病理学と生理学の境界領域に存在する多くの問題が関係している⁹⁾。これら3つの分野のどの1つをとっても歴史に残る偉業であるが、彼は自らのうち立てた実験医学の理念に基づいて、そのすべてをものしたのであり、かくしてフランスに実験医学の伝統の根を降下さしめることとなった。

年月を経てベルナルの医学方法論は、実験動物を用いた研究に利用されるだけでなく、生物を用いた試験にも広く用いられるようになり、やがてその量は肥大し、実験動物の“大量消費”

時代を到来させることになっていった。だから、ベルナルは、同時に、人類の歴史で最初の実験動物の「敵」でもあったといえることができる。ヒトへの毒性の判断に実験動物を用いて毒性予測をする方法は、これをシステム化した結果、安全性予測の方法に限りない進展をもたらしたが、同時に動物実験のニーズも限りなく増大した。とりわけ、“発がんのメカニズムは不明でも、発がん性の予測は可能”とする命題によって基礎づけられた「発がん性バイオアッセイ試験」は、実験動物で得られる情報を“蓋然性”から“可能性”に大胆に引き上げて解釈することにより、発がん性に対する驚異的な予測能力をもったトキシコロジーの方法を人類に提供するところとなった。結果として、他をもって替えることのできない実験動物の“消費”につながっていったことは皮肉であるが、これも科学史の過渡期における事柄と考えられなくもない。

ブルース・エームズ： 復帰突然変異試験の歴史的意義

ブルース・エームズ (Bruce N. Ames) がサルモネラ菌による復帰突然変異の検出によるスクリーニング系の開発を手がけた意図を聞いたことはないが、1973年にAmesらによって開発された復帰突然変異試験は、

安全性試験のために“工業的”に“消費”されはじめていた実験動物による発がん性試験に対して、哺乳綱動物を用いる必要のない試験法の展望を示した点で画期的な発明となった¹⁰⁾。今日Ames試験とよばれているこのサルモネラ菌の突然変異でヒトの発がん性の予測を試みる方法の予知能には、初期には当然のことながらさまざまな技術的問題が含まれていた。これに対して当初のHis⁻→His⁺の復帰突然変異を起こしやすい相補株を幾種類か選ぶ工夫に始まり、rfa⁻遺伝子の導入によって膜透過性の亢進を促したこと、uvrB⁻やpkM101による修復能の欠失を導入したことなど種々の改良が加えられた。わけても、ラット肝のミクロゾーム分画(S9mix)を用いて代謝を促すことにより、サルモネラ菌に対して直接の変異原性のない薬物についても変異原性のある物質への活性化を予知する方法を開発した成果は¹¹⁾、今日に至る実用的スクリーニング系の完成に大きく寄与した(図2)。

結局、発がん性というメカニズム特性故にということはあるにせよ、この試験管内試験で遺伝子突然変異活性が陽性となった物質に対しては、もはや利用の難しい物質として発がん性バイオアッセイ試験は行われず、利用が放棄されることが稀でなくなった。このためこれに該当する実験動物のニーズが一挙に消滅した。Amesが“すべての発がん物質が変異原物質だ!”¹²⁾と発表したとき、そのことは必ずしもAmesの意図するところではなかったと思われるが、この科学の発展は膨大な動物実験を一部にせよ初めて不必要なものにした点で歴史的に不朽の一歩となった。それはH. J. Mullerが放射線でショウジョウバエの表現型に変異原性を発見してから約半世紀¹³⁾、Charlotte Auerbachらがnitrogen mustardsに化学物質としてはじめての変異原性を証明し

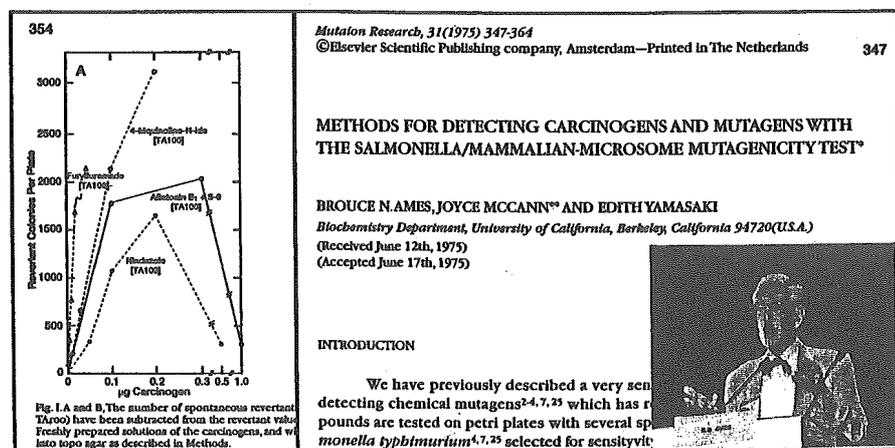


図2 ブルース・エームズとミクロゾーム分画を用いた試験管内代謝試験を発表した論文(1975年)写真は、2001年の第9回国際トキシコロジー学会(パリ)にて講演をするエームズ博士。

てから約30年のちのことである¹⁴⁾。

エームズの功績により、科学の発展が実験動物の運命を本質的に決定することが示唆されたが、今日的にみたときに将来の実験動物の運命を握るキーとその道筋とは如何なるものなのだろう。筆者は、それはマイクロアレイ技術を基礎としたトキシコジノミクスに負うところが甚大であろうと想定している。

**パトリック・ブラウン：
トランスクリプトームの描き出す未来像**

図3は、左手のマウスやラットなどいわゆるげっ歯目の動物の死亡カーブからヒトのそれに至るまでの変化を、縦軸を指数関数的に、横軸を通常尺でプロットしたものである。この図に明らかとなり、げっ歯目の動物から霊長目の動物まで、哺乳綱動物の寿命は連続的に次第に緩やかな寿命曲線をとるように発達して今日に至っており、それら相互の間には、基本的には遺伝子発現などの指標上の相互外挿性があるものと想定される。遺伝子発現を指標とした情報がその橋渡しになるものとの想定もこうした背景となる生物の進化を基礎にしている。

分子生物学の発展は、生物学の課題に対して、帰納的に背景機構を解析理解する方法と、演繹的に蓋然的な推論をする方法との双方向的戦略の可能性を切り開いた。トキシコジノミクスの技術的基礎はゲノムの大容量の発現情報処理にあり、後で述べるようなマイクロアレイ法やDNAチップ法の開発によって可能となった。トキシコジノミクスは、始まったばかりの新しい方法論である。「Nature Genetics」の特集に、Brown & BotsteinのDNAマイクロアレイの総説¹⁵⁾や、Debouck & Goodfellowの医薬品開発への応用の解説¹⁶⁾が掲載されたのは、わずか5年前のことに過ぎない。トキシコジノミクス

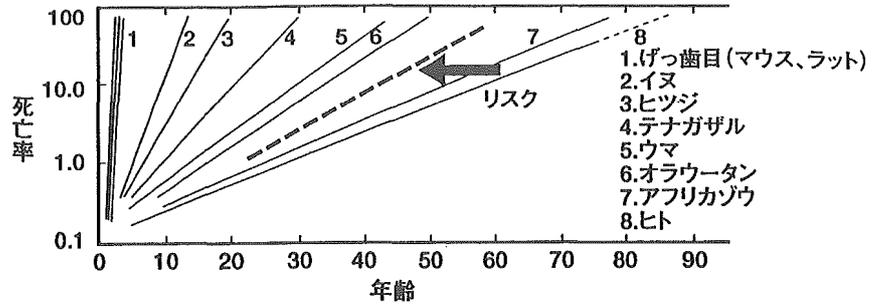


図3 ギンベルツ関数で示したおもな哺乳綱動物の死亡曲線
生体への毒性作用は、図の矢印(←)の方向に直線の傾きを急峻化する効果をもつ。

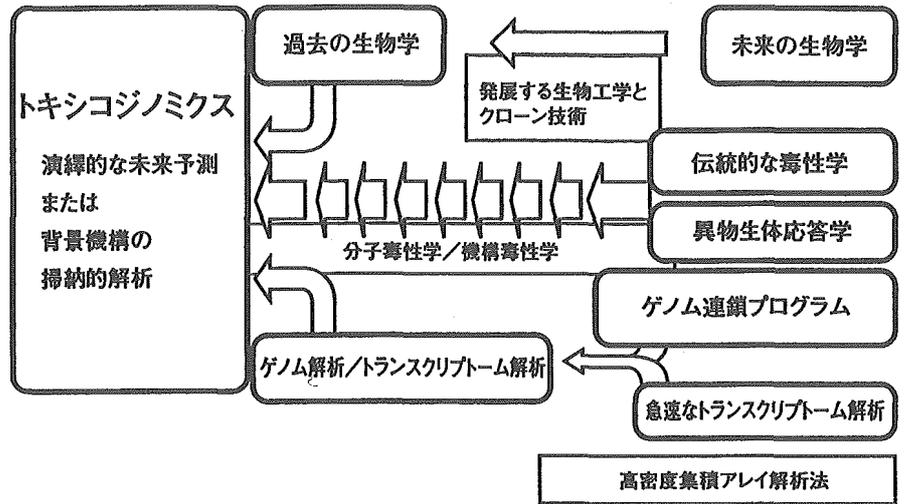


図4 トキシコジノミクスの成立に至る系譜
トキシコジノミクスは、①解析的ならびに演繹的手法に基づく生物学全般、②伝統的な毒性学と異物生体応答学、および、③ゲノム配列と高密度集積アレイ解析法の3つの流れが合流してきた新しい予測科学である。

では、他のゲノムサイエンスと同様、DNAマイクロアレイやジーンチップを基本技術として用いる^{17, 18, 19)}。DNAマイクロアレイは、スタンフォード大学のPatrick O. Brownらによる高密度集積アレイ解析法¹⁵⁾を基礎としており、cDNAを、スポッターを用いてガラス基盤上に固定し、これに組織から抽出したmRNAをcDNAに転写させると同時に蛍光標識してハイブリダイズさせている^{20, 21, 22)}。

このようなマイクロアレイ技術等をトキシコロジーに適用するのがトキシコジノミクスである²³⁾が、その結果、ゲノム科学が従来の帰納的解析 (inductive analysis) にとどまらず、演繹的 (deductive) に未来予測を可能とするツール (演繹的毒性学²⁴⁾ “deductive toxicology”) になったことは大いに注目し値する。図4は、トキシコジノミクスが

伝統的な従来よりのトキシコロジーと新しい生物学、ならびに高密度集積アレイ解析法の開発が合流して形成されたものであることを戯画化している。DNA発現情報は表徴型に比べて情報量は相対的に小さく、フェノタイプの持つcomplexityをカバーしきれないから、ここでの予測はある程度のカテゴリー分類を標的対象とすることが前提となる。今後の試行に待つところがないわけではないが、このカテゴリーに対応して浮上してくる新たなバイオマーカー発掘への期待は大きい²⁵⁾。

ここでトキシコジノミクスで整理しておきたい点は、このものを用いたりリスク評価の展望である。この点での道筋が明らかにならないと、いかに最もらしい展望が語られても実用化はおぼつかない。

まず、用量相関性についてみてみよ

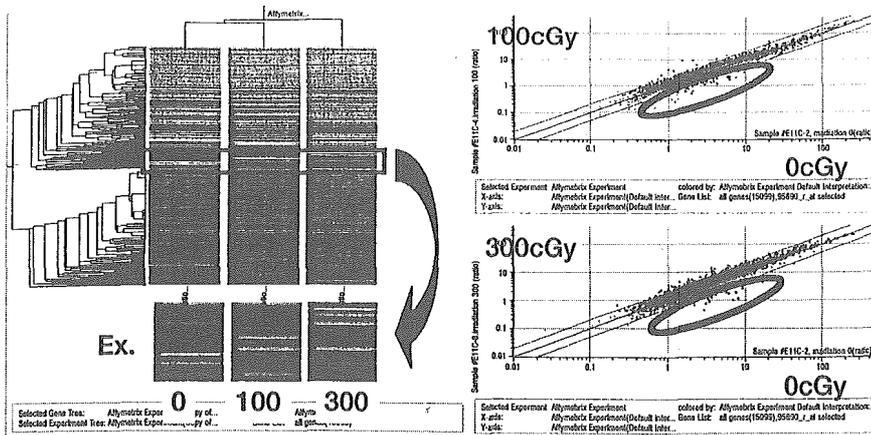


図5 異なる照射線量(γ線)の放射線暴露によって観察された遺伝子発現プロファイル線量によって発現が上昇する遺伝子群(黒枠で表現)と、それぞれの用量に特異的なプロファイリング(下部に抽出)とに注目。

う。用量と発現遺伝子の相関を考えるときに陥りやすい認識の隘路は、発現遺伝子を遺伝子発現の強さとの相関でみようとしがちになる点である。そうではなく個々の用量に特異的な発現遺伝子の組み合わせ(プロファイリング)を抽出することに焦点がある。つまり、遺伝子発現に対してアナログ的に変化する用量変化に注目するのではなく、デジタル的に浮かび上がってくる特異マーカーを探索することが焦点となる。図5をみると黒枠で表現された発現亢進プロファイリングに気づくと同時に、樹状デンドログラムの集中点に群間相互でまったく異なる発現プロファイルを示すグループが見出される。それらの当該処置特異性は別にタグをもうけるなりといった方法で特定する必要があるが、基本的にはこうしたプロファイリングの特性が、生物学的なマーカーになってゆく。そしてこの作業の延長線上に同様の考え方によって、無作用量(NOEL)や無毒性量(NOEL)に特異的なプロファイリングも浮上してくる。興味深いことに、ここで求められる特異的なプロファイリングは、それらの機能特性を考慮に入れて考察すると、必ずしも従来の試験結果に基づく値とは一致するとは限らないのであって、ある場合にはより高くなり、ある場合

にはより低くなる。そうした認識は、トキシコジノミクスリスク評価を、発現量や発現の強さの標準化に依存しがちな旧来のパラダイムによる呪縛から新しい発想へと解き放つ役割をもち、毒性学的に重要な意義がある。試験管内試験から個体レベル試験への外挿性について考えてみよう。図3を紹介した際に、種間外挿性への期待を述べた。たとえば、チオレドキシシン分子が大腸菌からヒトに至るまでよく保存されている通り、生体にエッセンシャルな分子の種間保存性は一般にきわめて高い。そうした要となる遺伝子群を中心に、未知の遺伝子を含む発現遺伝子のクロスチェックを進めてゆくことによって、ある程度のスクリーニング系が成立することにさしたる疑問はないであろう。近似したプロファイリングが見出せるならば、さらなる詳細な確認は必要としても、一義的にその時の両者の用量はそのまま機能的相同用量と認定されることになる。これに対して試験管内試験から個体レベル試験への外挿性の方は、机上で省察すると実際以上に困難が想定されることになる。一般論としては、心臓のない単細胞に対する試験管内影響が心臓毒性を予測するシステムとなり得るとはなかなか考えにくいからである。しかし

心毒性は、究極的には心筋や心臓血管系や、さらには心の刺激伝導系の特殊心筋細胞の細胞毒性にほかならず、そうした見地に立った試験管内データの個体レベルでの予測力(predictability)を視野にいたした試みも始まっている^{26, 27)}。生殖毒性における展望には今後の試行錯誤が予想されるが、発生毒性については胚幹細胞系の導入によって、従来型の検出力以上の形態形成期の網羅的遺伝子解析の展望が浮かび上がっている。とくにヒトの胚幹細胞のマイクロアレイ発現データのプロファイリングが確立されている²⁸⁾ので、これとの比較といったやり方で毒性学的な検討が進んでいる^{29, 30)}。したがって、分化の多能性を保持した胚幹細胞の培養・維持技術(図6)は標的細胞としてこのほか重要であり、ヒト胚幹細胞の培養にこのところの熱意が傾けられている背景には、移植や再生医学への利用にとどまらない広い応用への期待感がある³¹⁾。初期発生の形態形成プログラミングの研究によって明らかにされるシーケンシャルな遺伝子発現の成果は、近い将来、現在行われている動物実験におけるそれと比較にならない精度の発生毒性評価系を導き出すものと期待されるし、またその試験管内試験系が樹立される日も夢ではない。

論じるべき点は、生理学的遺伝子発現と毒性学の餌のそれとの分界点の問題をはじめ、標的遺伝子群を抽出するための処理時間(日数)の選定法など、

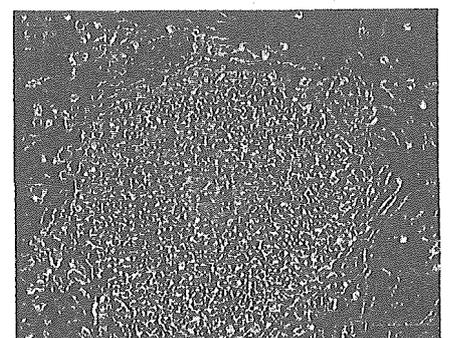


図6 培養性ヒト幹細胞
Science., 303, 2004³¹⁾表紙写真より

さまざまなトキシコロジー・タームに対する戦略が明らかになってきている。問題点も同時に多々あるが、誌面の制約もあるので最後に国際生命科学研究機構 (ILSI) が行った遺伝毒性に関する共同研究結果を紹介して、この項を終了しよう。

図7は、遺伝子傷害性が直接性の医薬品 (シスプラチン: CIS、メチルメタン sulfoneイト: MMS、マイトマイシンC: MMC) と非直接性の医薬品 (タキソール: TXL、ハイドロキシユレア: HU、エトポシド: ETP) における個体レベル投与と実験後の発現遺伝子を比較したものである。結果は、投与4時間後 (a) でも、投与24時間後 (b) でも、両者の遺伝子発現に際だった違いを示すことがわかるであろう。こうした峻別が未知の物質で可能かの如何についてはまだ問題がある。とくに遺伝子傷害性が直接性の化学品と非直接性の化学品とでの峻別に問題がなくとも、課題は遺伝子傷害性が非直接性の化学物質と非発がん性の物質との峻別がつくかどうかという点になると、必ずしも明瞭な分別点が得られるとは限らない。これらの展望については、今少し試験データを蓄積することが必要である。

おわりに

グロード・ベルナルが実験医学をうち立てた時、イギリスでは時を同じくして動物愛護協会が設立されている (1854年)³³⁾。彼の生体への飽くなき追求に対する嫌悪と罪悪感ゆえに、彼の死後、その妻と娘は、動物愛護の運動に身をおいたと伝えられている。そしてイギリスでは、1876年には動物虐待法が制定されている。ベルナルが歴史に果たした役割は本稿の冒頭で述べたが、伝えられている彼の考え方は、“生物の神秘的な内部を曝露し、その機能をみるためには、まず、屍体について解剖した後に、今度はさ

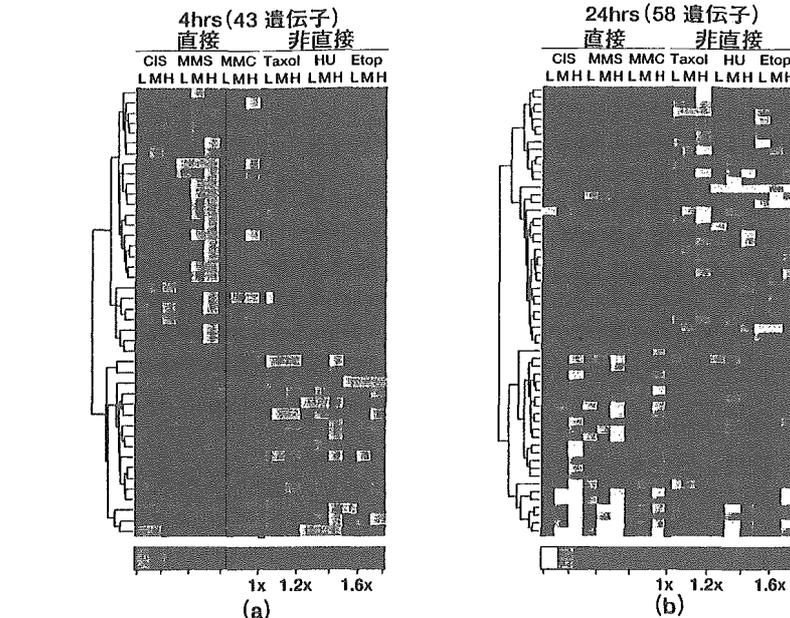


図7 発がん性のメカニズムの差異による発現遺伝子プロファイルの差異
直接性遺伝子傷害性の発がん性を示す医薬品 (シスプラチン: DIS、メチルメタン sulfoneイト: MMS、マイトマイシンC: MMC) と非直接性遺伝子傷害性の発がん性を示す医薬品 (タキソール: TXL、ハイドロキシユレア: HU、エトポシド: ETP) をラットに投与後の、両者における発現遺伝子の比較。結果は、投与4時間後 (a) でも、投与24時間後 (b) でも、両者の遺伝子発現に反対方向の隙だった違いが観察される (図下のバーコードの黒白パターンにみえるように黒色調は発現の亢進、白色調は抑制を示す)。

らに必ず生体に対しても解剖を行わなければならない”と云う徹底したものであった。ベルナルが強調したかったのは、当時医学の先端であった、ともすれば「生体解剖」とも見紛うような新しい外科学におけるヒトへの“解剖学的”外科処置 (vivisection) の風潮に対して、もっと事前にヒトに対する適用の前に実験医学研究をするよう促すことであった。それはヒトと実験動物の生物学的な共通性を認識の基礎とする近代生物学に立脚したものであったが、かくもその重要性の強調された動物実験は無麻酔下での生体解剖を重視するなどによって、その当初から激しい反対運動とその第一歩をとともに踏み出すことになったのであった。

動物実験がもっていた歴史的意義、実験動物の果たす役割はもとより限定的なものであるに違いない。“Animal Welfare”のドライビング・フォースには、すべての生物を同胞とする博愛主義とこれに根ざした種々の施策があり、その一環としては、ただちに実施可能で施策に移されるべき、必要な多くの

対応事項があり、本邦でも今これへの姿勢が問われている。そしてそれはそれで大いに積極的に対応を計る必要のあることは否定さるべきもない。

しかしすでにみてきたように科学の発展によって動物実験の必要性はその時代時代で格段に変遷してきたし、これからはさらに変化してゆくものと判断される。今トランスクリプトミクスによるデータの蓄積を始めたばかりの状況にあって、科学史の中に内在するものにはその変化を正確に認識することは容易ではないのだが、やがて蓄積される膨大な生物学の情報はこれまでの想像を絶するような規模の電算技術によってデジタル化され、蓄積され、アニマル・フリーで利用される時代を迎えようとしている。近頃、コンピューショナル・バイオロジーとよばれる分野³⁴⁾が各研究所に新設されつつある。これをアレイデータの電算処理部門と理解している向きもあるようであり、また事実そういうケースもあるようであるが、注目すべき本流の目指しているところは異なっている。それは、

名前こそ“バイオロジー”を冠しながら、そこには動物も細胞もまったく存在せず、否、生物学者すら存在しない。ちょっと意味が異なるが少し以前よりドライ・ラボという言葉もしばしば討論の端々に上るようになってきた。分子生物学の発達によって生物を分子の相互作用をもって理解する活動がもっとも盛んになってきた丁度そのさなかに、他方で、生物学はまったく新たな次のステップを目指して大きな質的変革を遂げるべく、その一歩を踏み出しつつあるのである。

[引用文献]

- 1) 井上達：毒性学の現状と展望—あたらしいバイオサイエンスとしての生体異物応答科学, 科学74(1): 18-23, 2004.
- 2) 医薬品非臨床試験研究会監修：医薬品非臨床試験ガイドライン解説2002, 薬事日報社, 東京, pp.287, 2002.
- 3) 動物の愛護および管理に関する法律 (平成11年制定).
- 4) 日本実験動物学会実験動物使用状況調査 (2001年調べ)：実験動物ニュース, 52(5): 143-151, 2003.
- 5) P F D'Arcy and D W G Harron, eds : Proceedings of the Fourth International Conference on Harmonization Brussels 1997, The Queen's University of Belfast, pp.1158.
- 6) クロード・ベルナル (三浦大栄訳)：実験医学序説, 岩波文庫, 1936.
- 7) 松田幸久：秋田大学バイオサイエンス教育研究センターウェブサイト, <http://www.med.akita-u.ac.jp/~doubutu/gijutubu/Bernard.html>.
- 8) 土屋貴志：大阪市大大学院文学研究科ウェブサイト, <http://www.lit.osaka-cu.ac.jp/~tsuchiya/vuniv99/exp-lec2.html>.
- 9) エズモンド E. ロング (難波絃二訳)：病理学の歴史, 西村書店, 1965.
- 10) Ames B N, Lee F D, Durston W E : An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70: 782-786, 1973.
- 11) Ames B N, Durston W E, Yamasaki E and Lee F D : Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria

- for detection, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70: 2281, 1973.
- 12) Ames B N, Durston W E, Yamasaki E and Lee F D : Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70: 2281, 1973.
- 13) Muller H J : Artificial transmutation of the gene, Science, 66: 84-87, 1927.
- 14) Auerbach C, Robson J M : Chemical production of mutations, Nature, 157: 302, 1946.
- 15) Brown P O and Botstein D : Exploring the new world of the genome with DNA microarrays, Nat Genet., 21: 33-37, 1999.
- 16) Debouck C and Goodfellow P N : DNA microarrays in drug discovery and development, Nat Genet., 21: 48-50, 1999.
- 17) Lovett R A : Toxicogenomics. Toxicologists brace for genomics revolution, Science, 289: 536-537, 2000.
- 18) Hamadeh H K, Bushel P, Paules R and Afshari C A : Discovery in toxicology: mediation by gene expression array technology, J. Biochem. Mol. Toxicol., 15: 231-242, 2001.
- 19) Storck T, von Brevern M C, Behrens C K, Scheel J, Bach A : Transcriptomics in predictive toxicology, Curr Opin Drug Discov Devel., 5: 90-97, 2002.
- 20) Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown P O and Davis R W : Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, Science, 270: 467-470, 1995.
- 21) Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown P O and Davis R W : Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes, Proc Natl Acad Sci USA, 93: 10614-10619, 1996.
- 22) このほかに、オリゴヌクレオチドプローブを光リトグラフィを用いて合成し、これに組織材料由来のmRNAをcRNAに変換してハイブリダイズするDNAチップ法がある (Fodor S P, Rava R P, Huang X C, Pease A C, Holmes C P and Adams C L : Multiplexed biochemical assays with biological chips, Nature, 364: 555-556, 1993).
- 23) T Inoue, W D Pennie, eds : Toxicogenomics, Springer-Verlag Tokyo, pp.1-11, 2003.
- 24) ここでいう演繹的毒性学とは、リバース・トキシコロジー(reverse toxicology)と同

義である。

- 25) Reynolds L J and Richards R J : Can toxicogenomics provide information on the bioreactivity of diesel exhaust particles? Toxicology, 165: 145-152, 2001.
- 26) Langheinrich U : Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk, Bioessays, 25: 904-912, 2003.
- 27) Kebat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L : Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes, J. Clin. Invest., 108: 407-414, 2001.
- 28) Ivanova N B, Dimos J T, Schaniel C, Hackney J A, Moore K A, Lemischka I R : A stem cell molecular signature, Science, 298: 601-604, 2002.
- 29) Richards M, Tan S P, Tan J H, Chan W K, Bongso A : The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE, Stem Cells, 22: 51-64, 2004.
- 30) Vallier L, Rugg-Gunn J P J, Bouhon I A, Andersson F K, Sadler A J, Pedersen R A : Enhancing and diminishing gene function in human embryonic stem cells, Stem Cells, 22: 2-11, 2004.
- 31) Hwang W S, Ryu Y J, Park J H, Park E S, Lee E G, Koo J M, Jeon H Y, Lee B C, Kang S K, Kim S J, Ahn C, Hwang J H, Park K Y, Cibelli J B, Moon S Y. : Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst, Science, 303: 1669-1674, 2004.
- 32) Hu T, Gibson D P, Carr G J, Torontali S M, Tiesman J P, Chaney J G and Ardema M J : Identification of a gene expression profile that discriminates indirect-acting genotoxins from direct-acting genotoxins, Mutat. Res, 549: 5-27, 2004.
- 33) 1854年, 動物虐待防止協会が設立される。
- 34) Timothy Zacharewski (平林容子抄訳)：コンピュータショナル・バイオロジー, In: 井上達, 井口泰泉編, 生体統御システムと内分泌攪乱, シュプリングー・フェアラーク社, 東京, 2005. 参照。

井上達 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生体試験研究センター長
横浜市立大学医学部卒。東京都老人総合研究所、
米国ブルックヘブン国立研究所、放射線医学総合
研究所などを経て、2001年より現職。専門は、実験
病理学、実験動物学、分子毒性学。現在は化学物
質の生体影響発現機構の研究を進めている。著書
に、「Toxicogenomics」(編著、Springer-Verlag
社、2003年)など。

Cytokine production and migration of in vitro-expanded NK1.1⁻ invariant V α 14 natural killer T (V α 14i NKT) cells using α -galactosylceramide and IL-2

Yoshinori Ikarashi^{a,*}, Akira Iizuka^{a,b,c}, Yuji Heike^a, Mitsuzi Yoshida^a,
Yoichi Takaue^b, Hiro Wakasugi^{a,*}

^a Pharmacology Division, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan

^b Hematopoietic Stem Cell Transplantation/Immunotherapy Unit, National Cancer Center Hospital, Tokyo, Japan

^c Department of Pathology and Immunology, Aging and Developmental Sciences, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo 113-8519, Japan

Received 31 March 2005; received in revised form 25 May 2005; accepted 26 May 2005

Available online 20 June 2005

Abstract

Mouse natural killer T cells with invariant V α 14 rearrangement (V α 14i NKT cells) can rapidly produce both Th1 and Th2 cytokines and regulate various immune responses, such as autoimmunity and tumor immunity. In this study, we describe the phenotypical and functional characterization of in vitro-expanded mouse V α 14i NKT cells from spleen using a combination of α -galactosylceramide (α -GalCer) and IL-2. The expanded V α 14i NKT cells retained the memory/activated (CD44⁺CD69⁺CD62L⁻) and CD4⁺ or CD4⁻8⁻ double negative phenotypes but modulated or lost the classical NKT cell marker, NK1.1. The expanded V α 14i NKT cells continuously released IL-4 and IFN γ and induced NK cell IFN γ production in vitro. Furthermore, the expanded V α 14i NKT cells migrated into the liver and spleen after adoptive transfer into lymphopenic SCID mice, and they were able to rapidly produce IL-4 and IFN γ after α -GalCer injection. Our findings suggest that the intrinsic characteristics of the cytokine secretion of V α 14i NKT cells were equivalent to that of in vitro-expanded V α 14i NKT cells. In vitro-expanded V α 14i NKT cells are considered to be useful for NKT cell defect-related diseases, such as autoimmunity and cancer. © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: CD1d; α -Galactosylceramide; NKT cell; Cytokine

1. Introduction

Mouse natural killer T cells with an invariant V α 14-J α 18 TCR rearrangement (V α 14i NKT cells) preferentially associate with V β 8.2, V β 7 or V β 2 TCR, recognize glycolipid antigens in the context of the non-classical MHC class I molecule CD1d [1–3], and respond strongly to a synthetic glycolipid, α -galactosylceramide (α -GalCer) [1–3]. The V α 14i NKT cells display a memory or activated phenotype (CD44^{high}CD62L⁻CD69⁺) and express NK cell mark-

ers, such as NK1.1 [1–3]. A feature of V α 14i NKT cells is the rapid secretion of several immunoregulatory cytokines, such as Th1 cytokines (IFN γ) and Th2 cytokines (IL-4 and IL-10) [1–3]. Cytokine production by V α 14i NKT cells plays an important role in various immune responses, including autoimmunity and tumor-immunity.

V α 14i NKT cells have antitumor activities [4,5]. V α 14i NKT cells exhibit direct cytotoxicity against various tumor cell lines [6] and rapidly produce IFN γ to induce NK cell activation [7,8]. Furthermore, the administration of α -GalCer, a specific ligand for V α 14i NKT cells, prevents tumor metastasis [9,10], and the antimetastatic activity of α -GalCer is mediated by sequential production of IFN γ by V α 14i NKT cells and NK cells [11,12].

* Corresponding authors. Tel.: +81 3 3547 5248; fax: +81 3 3542 1886.

E-mail addresses: yikarash@gan2.ncc.go.jp (Y. Ikarashi),

hwakasug@gan2.ncc.go.jp (H. Wakasugi).

In humans, NKT cells with invariant V α 24 chains paired with V β 11 chains (V α 24i NKT cells) are the counterpart to mouse V α 14i NKT cells, and they also respond to α -GalCer and rapidly secrete IFN γ and IL-4 [1–3]. Several investigators have reported the robust expansion of human V α 24i NKT cells from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using α -GalCer plus a combination of cytokines, such as IL-2, IL-7 and IL-15, *in vitro* [13–18]. α -GalCer-loaded dendritic cells and IL-2 also can induce the expansion of V α 24⁺ NKT cells from PBMCs [15,18]. After culture with α -GalCer and cytokines, the expanded human V α 24i NKT cells retain the ability to produce IFN γ and IL-4 [15,19], and they exhibit cytotoxic activity against tumor cell lines [20,21]. Recent studies have revealed significant reductions in numbers of V α 24i NKT cells and deficiencies in their proliferative responses and IFN γ production of V α 24i NKT cells in some patients with advanced cancer [22,23]. Therefore, adoptive transfer of *in vitro*-expanded V α 24i NKT cells is expected to induce antitumor activities in cancer patients with reduced circulating V α 24i NKT cell numbers.

It has been reported that mouse V α 14i NKT cells also respond to α -GalCer by proliferating *in vitro* [1–3]. However, little is known regarding the function and phenotype of *in vitro*-expanded V α 14i NKT cells because hitherto there was no appropriate marker to identify these cells. In this study, we used CD1d/ α -GalCer tetramer to monitor V α 14i NKT cells. We demonstrate that splenic V α 14i NKT cells can be expanded up to 8-fold after 4 days of culture with α -GalCer and IL-2. *In vitro*-expanded V α 14i NKT cells migrate to the liver and spleen of recipient mice and produce IFN γ and IL-4 *in vivo* after administration of α -GalCer.

2. Material and methods

2.1. Mice

Female C57BL/6N mice, BALB/cAnN mice and C.B-17/Icr SCID mice were purchased from Charles River Japan Inc. (Kanagawa, Japan). All mice were used at 8–12 weeks of age and maintained in our facilities. Animal studies were performed according to guidelines from the animal experimental ethics committee.

2.2. Cell culture

Spleen, liver, thymus and bone marrow mononuclear cells were prepared as previously described [24]. Mononuclear cells (1×10^6 cells/ml) were cultured in 7 ml of RPMI 1640 medium (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) supplemented with 8% fetal calf serum (JRH Biosciences, Lenexa, KS), 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol (Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO), 2 mM L-glutamine (Invitrogen), 1 mM sodium pyruvate (Invitrogen), 0.1 mM non-essential amino acids (Invitrogen), 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (Invitrogen) in 25 cm² culture flask (Greiner Bio-

One GmbH, Germany). α -GalCer (50 ng/ml; Pharmaceutical Research Laboratory, Kirin Brewery, Gunma, Japan) and/or recombinant human IL-2 (100 IU/ml; Takeda Chemical Ind. Ltd., Osaka, Japan) were added to the culture. On day 4, non- and semi-adherent cells were harvested, spun down and resuspended in the medium. The cells (5×10^5 cells/ml) were cultured in 7 ml of the medium in the presence of α -GalCer and/or IL-2 for an additional 2 days.

2.3. Flow cytometry

The surface phenotype of cells was determined by multi-color flow cytometry as previously described [24]. Before staining cells with mAb, cells were pre-incubated with anti-CD16/32 (clone 2.4G2) to block non-specific FcR γ binding. The following antibodies were used in this study: FITC- or PE-conjugated anti-CD3 (clone 145-2C11) or anti-CD24 (clone M1/69), PE-conjugated anti-NK1.1 (clone PK136), anti-CD69 (clone H1.2F3), or anti-IL-2R β (clone TM- β 1), and APC-conjugated mouse CD1d tetramers loaded with α -GalCer (CD1d/ α -GalCer tetramers). Stained cells were analyzed using a FACSCalibur equipped with CELLQuest software (BD Biosciences, San Jose, CA). Dead cells were excluded by propidium iodide staining and electronic gating. The data were processed with Flow Jo software (Tree Star, San Carlos, CA). For intracellular staining, cells were stimulated for 2 h with 25 ng/ml PMA and 1 μ g/ml ionomycin. The cells were then washed and incubated with anti-CD16/32, stained with PE-conjugated α -GalCer/CD1d tetramers, permeabilized with Cytofix/Cytoperm (BD PharMingen), and stained with APC-conjugated anti-IL-4 (clone 11B11), IFN γ (clone XMG1.2), or rat IgG1 isotype control (clone R3-34). The stained cells were analyzed using a FACSCalibur. All mAbs were purchased from BD PharMingen. PE- or APC-conjugated CD1d/ α -GalCer tetramers were prepared in a baculovirus expression system as previously described [25]. Mouse CD1d/ β 2-microglobulin expression vector was provided by Dr. M. Kronenberg (La Jolla Institute for Allergy and Immunology, San Diego, CA).

2.4. Cytokine levels

Culture supernatants were collected following 1, 4, or 6 days of culture and stored at -20°C before analysis. IFN γ and IL-4 concentrations in culture supernatants were determined by ELISA kits (OptEIA ELISA set; BD PharMingen).

2.5. Adoptive transfer of *in vitro*-expanded V α 14i NKT cells

Spleen cells from BALB/cAnN mice were culture in the presence of α -GalCer and IL-2 for 4 days. The cultured spleen cells containing expanded V α 14i NKT cells (2×10^7) were transferred *i.v.* to C.B-17/Icr SCID mice. The recipient mice were killed on day 7 after cell transfer, and the percentage of CD1d/ α -GalCer tetramer⁺ cells in the spleen and liver were

determined by flow cytometry. The serum levels of IFN γ and IL-4 in mice injected with cultured cells 7 days earlier were analyzed at 0, 4, and 10 h after i.p. injection of α -GalCer (2 μ g).

3. Results

3.1. Expansion of mouse V α 14i NKT cells in vitro

Consistent with previous results [25,26], we observed that 1.2% of freshly isolated spleen cells comprised V α 14i NKT cells (Fig. 1A). When spleen cells were cultured in the presence of 50 ng/ml α -GalCer, the percentage and absolute number of V α 14i NKT cells increased to 6.7% and 8-fold, respectively, after 4 days culture (Fig. 1). α -GalCer-induced human V α 24⁺V β 11⁺ NKT cell expansion can be potentiated by IL-2, IL-7, or IL-15 [13–18]. To examine whether IL-2 augments mouse V α 14i NKT cell expansion by α -GalCer, spleen cells were cultured in the presence of α -GalCer and 100 U/ml IL-2. V α 14i NKT cells were more vigorously expanded when cultured with α -GalCer and IL-2 as compared with α -GalCer alone. IL-15 also enhanced α -GalCer-induced V α 14i NKT cell expansion (data not shown). V α 14i NKT cell expansion peaked after 4 days of culture with α -GalCer alone, whereas IL-2 prolonged V α 14i NKT cell expansion by α -GalCer past 4 days in culture (Fig. 1B). Furthermore, V α 14i NKT cells in thymus, liver, and bone marrow could be expanded in the

presence of α -GalCer and IL-2 (data not shown). However, V α 14i NKT cells were not expanded in the presence of IL-2 alone (Fig. 1). It should be noted that in vitro expansion of V α 14i NKT cells is dependent on α -GalCer.

NK1.1⁺ T cells, which are classical NKT cells, increased to around 5-fold after 4 days culture in the presence of IL-2 with or without α -GalCer (Fig. 1). Furthermore, they increased to around 20-fold after 6 days culture. Like NK1.1⁺ T cells, NK cells expanded in the presence of IL-2. Thus, the expansion of NK1.1⁺ T cells and NK cells is dependent on IL-2 but not α -GalCer.

3.2. Phenotypes of in vitro-expanded V α 14i NKT cells

Because the expansion of V α 14i NKT cells and NK1.1⁺ T cells was dependent on α -GalCer and IL-2, respectively, we next examined whether the V α 14i NKT cells were identical to NK1.1⁺ NKT cells after culture with α -GalCer and IL-2. Consistent with previous studies [25,26], half of NK1.1⁺ T cells were CD1d/ α -GalCer tetramer⁺ cells and around 70% of V α 14i NKT cells expressed NK1.1 in the spleen (Fig. 2A). However, after culture, almost all V α 14i NKT cells lost expression of NK1.1. Our results indicate that the expanded V α 14i NKT cells are distinct from the expanded NK1.1⁺ T cells following in vitro culture.

We analyzed the phenotype of the expanded V α 14i NKT cells as compared with fresh V α 14i NKT cells. As shown in Fig. 2B, the expanded V α 14i NKT cells maintained memory

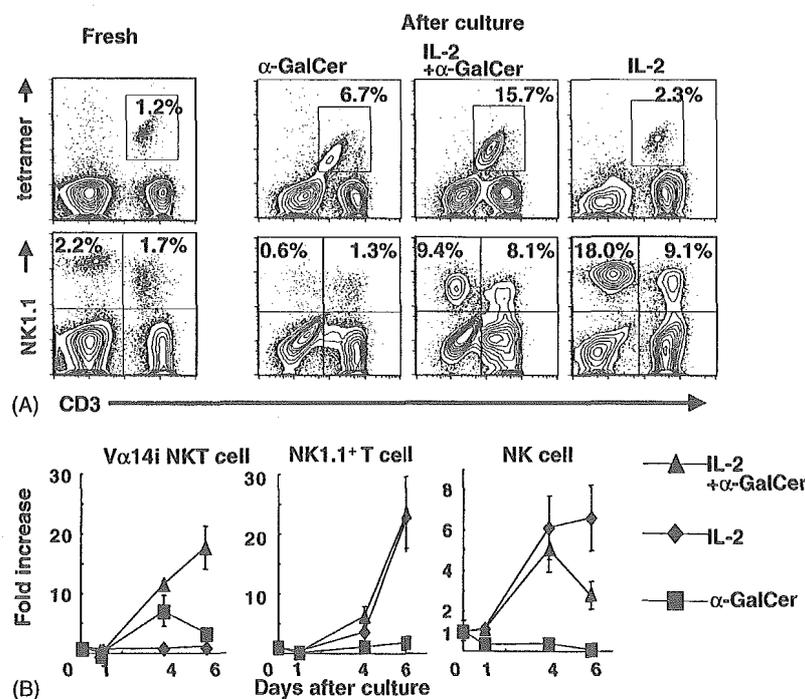


Fig. 1. In vitro expansion of V α 14i NKT cells. (A) C57BL/6 mice spleen cells (7×10^6) were cultured with 50 ng/ml α -GalCer, α -GalCer plus 100 U/ml IL-2, or IL-2 for 4 days. The percentages of V α 14i NKT cells, NK cells, and NK1.1⁺ T cells were determined. Fresh and cultured cells were stained with mAbs and CD1d/ α -GalCer tetramer and analyzed by flow cytometry. The fluorescence profiles are representative of at least five independent experiments. (B) The fold increase in V α 14i NKT cells after culture with IL-2 plus α -GalCer (\blacktriangle), IL-2 alone (\blacklozenge), or α -GalCer alone (\blacksquare) was calculated from cell counts and flow cytometric data. Data are means obtained from three mice per point.

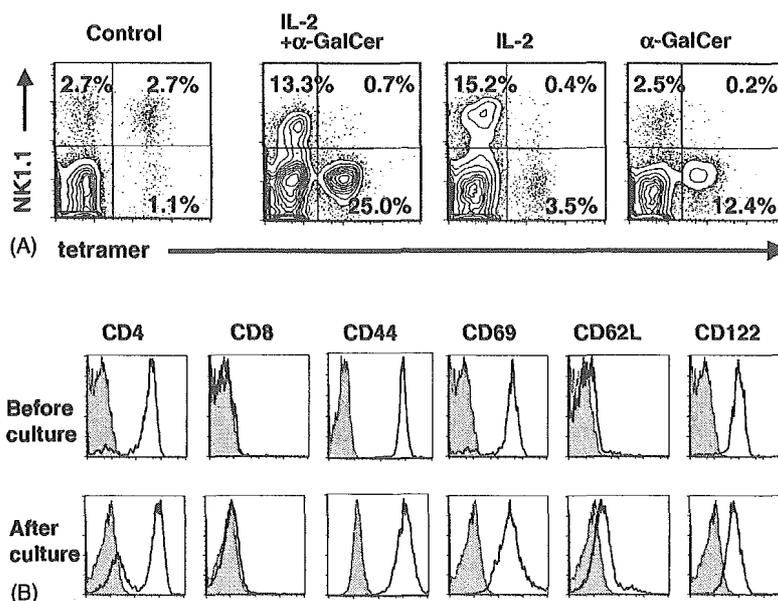


Fig. 2. Phenotype of in vitro-expanded V α 14i NKT cells. (A) NK1.1 expression in in vitro-expanded V α 14i NKT cells was examined after 4 days culture. Fresh and cultured cells were stained with CD1d/ α -GalCer tetramer, anti-CD3, and anti-NK1.1 mAb. The cells were analyzed by flow cytometry and gated on CD3-positive cells. The fluorescence profiles are representative of at least five independent experiments. (B) The surface marker expression of fresh and expanded V α 14i NKT cells was compared by flow cytometry. Histogram panels are gated on CD1d/ α -GalCer tetramer⁺ CD3⁺ cells. Shadow histograms indicate non-stained controls. The fluorescence profiles are representative of at least three independent experiments.

or activated phenotypes (CD44^{high}CD62L⁻CD69⁺) whereas the expression of IL-2R β was down-regulated. Similar to fresh V α 14i NKT cells, the expanded V α 14i NKT cells consisted of CD4⁺ and CD4⁻CD8⁻ double negative subsets (Fig. 2B). In addition, some expanded V α 14i NKT cells maintained CD94 expression and down-regulated NKG2D, although some fresh V α 14i NKT cells express NK receptors, such as CD94 and NKG2D (data not shown). These results indicate that expanded V α 14i NKT cells maintain the memory or activated phenotypes but modulate the expression of NK cell-related molecules.

3.3. In vitro-expanded V α 14i NKT cells retain the ability to produce cytokines

It has been reported that α -GalCer induces rapid activation of V α 14i NKT cells and a burst of IL-4 and IFN γ secretion in vivo and in vitro [8–10]. Therefore, we examined the ability of expanded V α 14i NKT cells to secrete IL-4 and IFN γ . First, we analyzed IL-4 and IFN γ levels in the supernatants of spleen cells cultured with α -GalCer and/or IL-2 (Fig. 3A). We detected a larger amount of IL-4 and IFN γ in the supernatant when cultured in the presence of α -GalCer. Furthermore, the addition of IL-2 to the culture with α -GalCer slightly enhanced the production of IL-4 and IFN γ . No IL-4 and a low amount of IFN γ were detected when spleen cells were cultured with IL-2 alone.

Next, we used intracellular cytokine staining to determine if expanded V α 14i NKT cells directly secrete IL-4 and IFN γ in vitro (Fig. 3B). IL-4 producing cells comprised mainly expanded V α 14i NKT cells. Seventy percent of expanded

V α 14i NKT cells contained intracellular IFN γ . These results suggest that expanded V α 14i NKT cells retain the ability to produce cytokines in vitro. In addition to expanded V α 14i NKT cells, 70% of CD1d/ α -GalCer tetramer⁻ T cells and 40% of CD1d/ α -GalCer tetramer⁻ CD3⁻ cells were also positive for intracellular IFN γ . The IFN γ producing CD1d/ α -GalCer tetramer⁻ CD3⁻ cells were mainly NK cells but not B cells (data not shown). It should be noted that NK cells and some T cells acquired the ability to produce IFN γ when cultured with α -GalCer and IL-2 but not IL-2 alone.

3.4. In vivo survival and cytokine production of expanded V α 14i NKT cells after adoptive transfer

We examined the ability of expanded V α 14i NKT cells to survive and migrate to peripheral tissues after adoptive transfer. Spleen cells cultured with α -GalCer and IL-2 were transferred into lymphopenic SCID mice. Seven days after transfer, the mice were killed and the CD1d/ α -GalCer tetramer⁺ cells in the liver and spleen were analyzed. As shown in Fig. 4, around 7% of hepatic mononuclear cells were CD1d/ α -GalCer tetramer⁺ T cells. The percentage of CD1d/ α -GalCer tetramer⁺ cells in the spleen was equal to that observed in normal mice (Figs. 1A and 4). Although it has been known that V α 14i NKT cells are abundant in bone marrow in normal mice, we observed very few CD1d/ α -GalCer tetramer⁺ cells in bone marrow (data not shown). The expanded V α 14i NKT cells were detected at least 3 weeks after transfer (data not shown). There were no differences in the phenotype of in vitro-expanded V α 14i NKT cells before and after transfer into SCID mice.

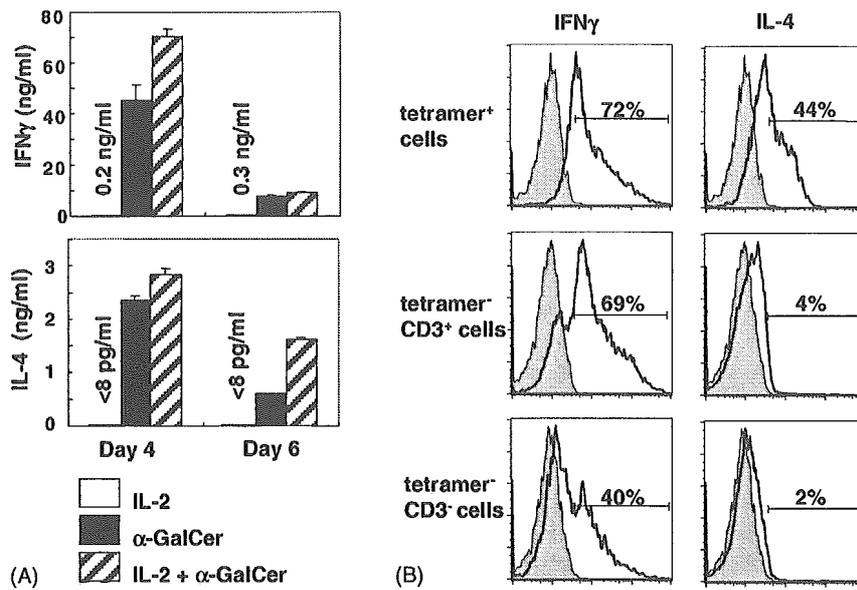


Fig. 3. Cytokine production profile of Vα14i NKT cells, NK cells, and NK1.1⁺ T cells after culture. (A) Spleen cells (7×10^6) from C57BL/6 mice were cultured with 50 ng/ml α-GalCer, α-GalCer plus 100 U/ml IL-2, or IL-2 for 4 and 6 days. IFNγ and IL-4 in the supernatants were measured by ELISA. Data are representative of three independent experiments. (B) Intracellular cytokine staining for IFNγ and IL-4 in spleen cells cultured with α-GalCer and IL-2 for 4 days. The cultured cells were stimulated with PMA and ionomycin for 2 h. Then, the cells were stained with CD1d/α-GalCer tetramer, anti-CD3 mAb, and anti-IL-4, IFNγ, or isotype control mAb and analyzed by flow cytometry. Histogram panels are on CD1d/α-GalCer tetramer⁺ CD3⁺ cells (Vα14i NKT cells), CD1d/α-GalCer tetramer⁻ CD3⁺ cells (including NK1.1⁺ T cells), or CD1d/α-GalCer tetramer⁻ CD3⁻ cells (including NK cells). Closed histograms indicate isotype controls. The fluorescence profiles are representative of three independent experiments.

Next, we examined the ability of the adoptively transferred, in vitro-expanded Vα14i NKT cells, to secrete IL-4 and IFNγ after administration of α-GalCer. Seven days after cell transfer, the mice were injected with 2 μg of α-GalCer.

The serum levels of IL-4 and IFNγ were analyzed by ELISA. Four hours after the α-GalCer injection, IL-4 and IFNγ were detected in the serum of mice that had received cultured cells (Fig. 5A). One hour after α-GalCer administration, intracellular cytokine staining for CD1d/α-GalCer tetramer⁺ T cells in the spleen revealed that intracellular IL-4 and IFNγ were detected in 50 and 30% of CD1d/α-GalCer tetramer⁺ T cells, respectively (Fig. 5B). These results indicate that the expanded Vα14i NKT cells re-exposed to α-GalCer retain the ability to produce IL-4 and IFNγ after adoptive transfer.

It has been reported that increased IFNγ levels in the serum of normal mice 10–16 h after α-GalCer injection were due to IFNγ production by NK cells [11]. However, 10 h after the α-GalCer injection, the IFNγ level was decreased in the mice that had previously received the cultured cells. Therefore, the in vitro-expanded Vα14i NKT cells could not induce NK cell IFNγ production in vivo. Previous reports have demonstrated that diminished IFNγ levels in the serum of α-GalCer-primed mice were caused by a failure of NK cell IFNγ production after α-GalCer re-injection [27]. Thus, the in vitro-expanded Vα14i NKT cells might be similar to primed Vα14i NKT cells.

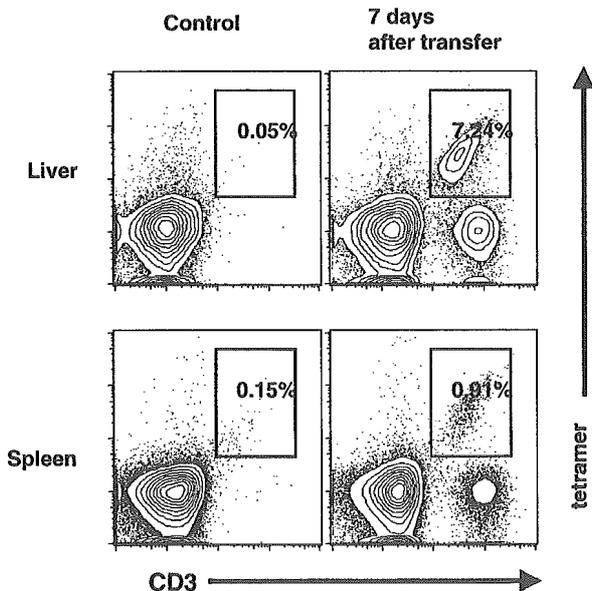


Fig. 4. Migration of in vitro-expanded Vα14i NKT cells after adoptive transfer. Spleen cells from BALB/c mice were cultured with α-GalCer plus 100 U/ml IL-2 for 4 days. The cultured cells (2×10^7) were injected into C.B-17/ICr SCID mice. Recipient mice were killed after 7 days, and the presence of transferred Vα14i NKT cells in the liver and spleen was determined by flow cytometry. The fluorescence profiles are representative of three independent experiments.

4. Discussion

NKT cells play an important role in various immune responses, including autoimmunity and tumor immunity [1–3]. The administration of α-GalCer, a specific ligand

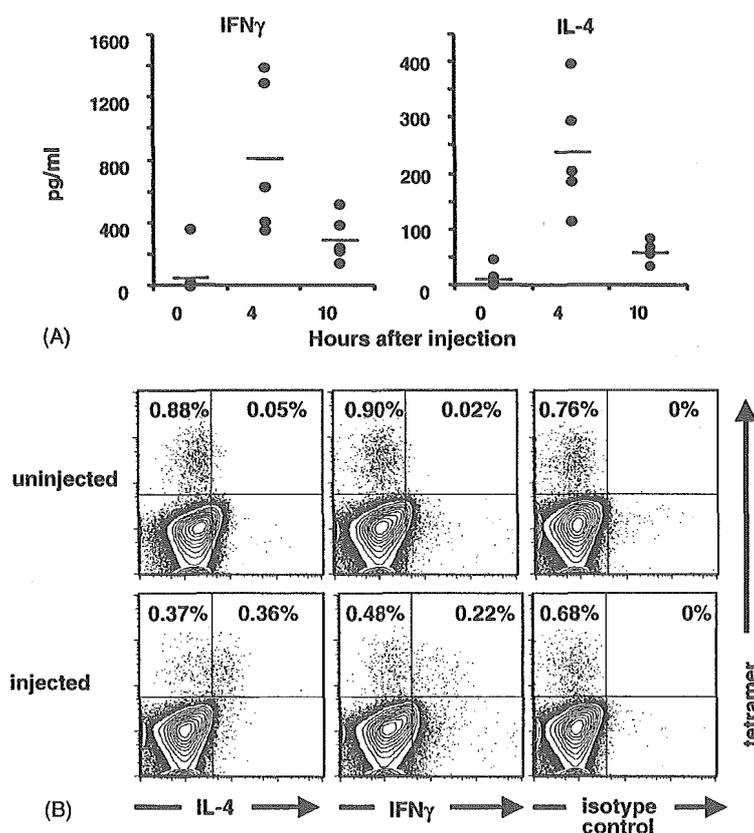


Fig. 5. IFN γ and IL-4 production of in vitro-expanded V α 14i NKT cells after adoptive transfer. Spleen cells from BALB/c mice were cultured with α -GalCer plus 100 U/ml IL-2 for 4 days. The cultured cells (2×10^7) were injected into C.B-17/ICr SCID mice. (A) Serum IFN γ and IL-4 levels. Seven days after the cells were injected, the serum cytokine levels were analyzed 0, 4, and 10 h after i.p. injection of α -GalCer. Data were obtained from 5 to 7 mice. (B) Intracellular cytokine staining of splenocytes 2 h after i.p. injection of α -GalCer (2 μ g) in mice injected with cultured cells (2×10^7) 7 days earlier. Cells were stained with CD1d/ α -GalCer tetramer and anti-IL-4, IFN γ , or isotype control mAb. Stained cells were analyzed by flow cytometry. The fluorescence profiles are representative of three independent experiments.

for V α 14i NKT cells, prevents tumor metastasis [9,10] and autoimmune disease [28–30]. Moreover, the adoptive transfer of NKT cells in mice prevents type I autoimmune diabetes [31] and tumor metastasis [12,32]. These studies suggest several possible therapeutic applications for adoptive immune therapy with NKT cells. However, it is apparent that the frequency of NKT cells is very low in human blood. Therefore, in vitro NKT cell expansion is required for adoptive immunotherapy with these cells. In this study, we found that in vitro-expanded V α 14i NKT cells are able to migrate into liver and spleen, and produce cytokines after adoptive transfer.

Human V α 24⁺V β 11⁺ T cells in peripheral blood mononuclear cells expand in vitro using α -GalCer and IL-2, IL-7, or IL-15 [13–19], and mouse V α 14i NKT cells also proliferate in the presence of α -GalCer in vitro [1–3]. However, the function and phenotype of in vitro-expanded V α 14i NKT cells have not been well characterized because there is no appropriate marker to identify these cells. In previous studies, NKT cells have been identified as NK1.1⁺ T cells. However, some V α 14i NKT cells do not express NK1.1 [25,26], and V α 14i NKT cells lose or down-regulate the expression of NK1.1 in vivo after stimulation [33,34]. Therefore, the NK1.1

marker is not expressed on V α 14i NKT cells after stimulation. We could detect in vitro-expanded V α 14i NKT cells by CD1d/ α -GalCer tetramer. However, an issue with CD1d/ α -GalCer tetramer staining is that the surface expression of V α 14i NKT cells is also down-regulated at 8–12 h after α -GalCer-stimulation [33,34]. Although their TCR expression was recovered to normal levels at 24–48 h [33,34], it is not an issue whether the numbers of in vitro-expanded V α 14i NKT cells (at 4 and 6 days after culture) is an underestimate of the actual number. These in vitro-expanded V α 14i NKT cells in the presence of α -GalCer do not express NK1.1. It has been reported that NK1.1⁻ CD1d/ α -GalCer tetramer⁺ T cells exist in normal mice and that some of these cells are immature NKT cells that have recently emigrated from the thymus [35,36]. However, recent studies have shown that expanded NK1.1⁻ V α 14i NKT cells originate from NK1.1⁺ V α 14i NKT cells that down-regulate their surface NK1.1 expression [33,34]. We considered two possibilities for the origin of in vitro-expanded V α 14i NKT cells: expansion of NK1.1 down-regulated NKT cells and/or expansion of NK1.1⁻ precursor NKT cells. We observed that some V α 14i NKT cells expanded when NK1.1⁻ spleen cells were cultured (data not shown). Therefore, we concluded that both

NK1.1⁺ and NK1.1⁻ NKT cells expand after in vitro α -GalCer-stimulation.

Previous studies demonstrated that mouse and human invariant NKT cells could produce both Th1 and Th2 cytokines [1–3]. Furthermore, it was reported that adult V α 24⁺ V β 11⁺ NKT cells did not polarize into Th1 or Th2 after expansion [37]. However, NKT cells display polarization induced by type 1 or 2 dendritic cells [19]. Th1 or Th2 polarization of NKT cells is believed to be influenced by culture environment, such as the type of dendritic cell. We showed that in vitro-expanded V α 14i NKT cells continuously produced both IL-4 and IFN γ and did not polarize into Th1- or Th2-type. By contrast, a previous study has demonstrated that the robust expanded V α 14i NKT cells (after α -GalCer administration) continue to produce IFN γ in vivo [34]. This suggests that in vivo-expanded V α 14i NKT cells favor Th1 polarization. In contrast to in vivo-expanded V α 14i NKT cells, in vitro-expanded V α 14i NKT cells might remain continually activated and produce both IFN γ and IL-4 because they are continually exposed to α -GalCer in the culture conditions. Indeed, in the expansion phase of V α 14i NKT cells (after α -GalCer injection), these V α 14i NKT cells had the ability to secrete large amounts of both cytokines when re-injected with α -GalCer (Ikarashi et al., unpublished data).

In addition to the IFN γ production by in vitro-expanded V α 14i NKT cells, we showed that NK cells and NK1.1⁺ T cells acquired the ability to produce IFN γ when cultured with α -GalCer and IL-2. IL-2 alone could induce the proliferation, but not IFN γ production, by NK cells and NK1.1⁺ T cells in vitro. Our results indicate that α -GalCer-induced V α 14i NKT cell activation leads to IFN γ production of NK and NK1.1⁺ T cells in vitro. Previous in vivo studies have demonstrated rapid cytokine production by V α 14i NKT cells in response to α -GalCer triggered activation and IFN γ production by NK cells [7,8], and bystander activation by conventional T cells and B cells [38,39]. Taken together, the mechanisms of NK cell activation by V α 14i NKT cells in vitro might be similar to the in vivo mechanisms.

V α 14i NKT cells have been known to regulate immune responses [1–3]. In fact, previous studies have shown that adoptive transfer of thymic NKT cells prevented type I diabetes in NOD mice in an IL-4- and IL-10-dependent manner (T helper 2) [31]. Furthermore, hepatic metastasis of B16 melanoma was prevented by adoptive transfer of IL-12-activated V α 14i NKT cells from V α 14 TCR transgenic mice [32]. These observations indicate that adoptive V α 14i NKT cell immunotherapy is useful for autoimmune diabetes and cancer. However, important questions remain as to whether in vitro-expanded V α 14i NKT cells can survive in the recipients and maintain the ability to produce IFN γ and IL-4 after transfer, similar to resident V α 14i NKT cells. A previous study demonstrated that fresh mouse V α 14i thymocytes proliferated and survived in an IL-15-dependent manner after adoptive transfer into lymphopenic mice [40]. We found that in vitro-expanded V α 14i NKT cells survived and dominantly migrated into the liver of lymphopenic mice. Furthermore,

we revealed that in vitro-expanded V α 14i NKT cells 7 days after transfer could respond to α -GalCer and secrete IL-4 and IFN γ after administration of α -GalCer. However, IFN γ production patterns of lymphopenic mice transferred with in vitro-expanded V α 14i NKT cells after administration of α -GalCer were similar to those of α -GalCer-primed mice, as reported previously [27].

Previous studies have demonstrated that the antitumor effect of α -GalCer is mediated by V α 14i NKT cells [9–12] and that the IFN γ production by V α 14i NKT cells and the subsequent IFN γ production by NK cells are critical for α -GalCer to mediate antitumor activity [11,12]. Although it appears that α -GalCer-based immunotherapy is useful for cancer, treatment with α -GalCer has shown little therapeutic effect in patients with solid tumors [41]. For these reasons, it has been proposed that human V α 24i NKT cells from cancer patients have impaired proliferative responses to α -GalCer and have lost the ability to produce IFN γ [22,23]. We believe that adoptive V α 24i NKT cell therapy may be beneficial for cancer patients. Further studies are needed to clarify the mechanism and clinical applicability of in vitro-expanded V α 24i NKT cell therapy in cancer.

Acknowledgments

We thank Dr. Mitchell Kronenberg for his helpful suggestions and Dr. Gary Quinn for critical review of the manuscript. This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Second Term Comprehensive 10-year Strategy for Cancer Control from the Ministry of Health, Labour and Welfare and by Grants-in-Aid for Cancer Research from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. Dr. Yoshinori Ikarashi was also supported by a Grant-in-Aid from the Ministry of Education, Science, Culture, Sports and Technology of Japan.

References

- [1] Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 2000;21:573–83.
- [2] Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2002;2:557–68.
- [3] Taniguchi M, Harada M, Kojo S, Nakayama T, Wakao H. The regulatory role of V α 14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Annu Rev Immunol* 2003;21:483–513.
- [4] Cui J, Shin T, Kawano T, Sato H, Kondo E, Toura I, et al. Requirement for V α 14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 1997;278:1623–6.
- [5] Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, et al. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* 2000;191:661–8.
- [6] Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Sato H, et al. Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated V α 14 NKT cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5690–3.
- [7] Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, et al. Cutting edge: cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol* 1999;163:4647–50.

- [8] Eberl G, MacDonald HR. Selective induction of NK cell proliferation and cytotoxicity by activated NKT cells. *Eur J Immunol* 2000;30:985–92.
- [9] Kobayashi E, Motoki K, Uchida T, Fukushima H, Koezuka Y. KRN7000 a novel immunomodulator, and its antitumor activities. *Oncol Res* 1995;7:529–34.
- [10] Nakagawa R, Motoki K, Ueno H, Iijima R, Nakamura H, Kobayashi E, et al. Treatment of hepatic metastasis of the colon26 adenocarcinoma with an α -galactosylceramide, KRN7000. *Cancer Res* 1998;58:1202–7.
- [11] Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Van Kaer L, et al. Critical contribution of IFN- γ and NK cells, but not perforin-mediated cytotoxicity, to anti-metastatic effect of α -galactosylceramide. *Eur J Immunol* 2001;31:1720–7.
- [12] Smyth MJ, Crowe NY, Pellicci DG, Kyparissoudis K, Kelly JM, Takeda K, et al. Sequential production of interferon-gamma by NK1.1⁺ T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of α -galactosylceramide. *Blood* 2002;99:1259–66.
- [13] Brossay L, Chioda M, Burdin N, Koezuka Y, Casorati G, Dellabona P, et al. CD1d-mediated recognition of an α -galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *J Exp Med* 1998;188:1521–8.
- [14] Nishi N, van der Vliet HJ, Koezuka Y, von Blumberg BM, Scheper RJ, Pinedo HM, et al. Synergistic effect of KRN7000 with interleukin-15, -7, and -2 on the expansion of human V α 24⁺V β 11⁺ T cells in vitro. *Hum Immunol* 2000;60:357–65.
- [15] van der Vliet HJ, Nishi N, Koezuka Y, von Blumberg BM, van den Eertwegh AJ, Porcelli SA, et al. Potent expansion of human natural killer T cells using α -galactosylceramide (KRN7000)-loaded monocyte-derived dendritic cells, cultured in the presence of IL-7 and IL-15. *J Immunol Methods* 2001;247:61–72.
- [16] Asada-Mikami R, Heike Y, Harada Y, Kanai S, Ikarashi Y, Kato K, et al. Increased expansion of V α 24⁺ T cells derived from G-CSF-mobilized peripheral blood stem cells as compared to peripheral blood mononuclear cells following α -galactosylceramide stimulation. *Cancer Sci* 2003;94:383–8.
- [17] Rogers PR, Matsumoto A, Naidenko O, Kronenberg M, Mikayama T, Kato S. Expansion of human V α 24⁺ NKT cells by repeated stimulation with KRN7000. *J Immunol Methods* 2004;285:197–214.
- [18] Nieda M, Nicol A, Koezuka Y, Kikuchi A, Takahashi T, Nakamura H, et al. Activation of human V α 24NKT cells by α -glycosylceramide in a CD1d-restricted and V α 24TCR-mediated manner. *Hum Immunol* 1999;160:10–9.
- [19] van der Vliet HJ, Molling JW, Nishi N, Masterson AJ, Kolgen W, Porcelli SA, et al. Polarization of V α 24⁺ V β 11⁺ natural killer T cells of healthy volunteers and cancer patients using α -galactosylceramide-loaded and environmentally instructed dendritic cells. *Cancer Res* 2003;63:4101–6.
- [20] Kawano T, Nakayama T, Kamada N, Kaneko Y, Harada M, Ogura N, et al. Antitumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human V α 24 NKT cells. *Cancer Res* 1999;59:5102–5.
- [21] Takahashi T, Nieda M, Koezuka Y, Nicol A, Porcelli SA, Ishikawa Y, et al. Analysis of human V α 24⁺ CD4⁺ NKT cells activated by α -glycosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2000;164:4458–64.
- [22] Tahir SM, Cheng O, Shaulov A, Koezuka Y, Bublek GJ, Wilson SB, et al. Loss of IFN- γ production by invariant NK T cells in advanced cancer. *J Immunol* 2001;167:4046–50.
- [23] Yanagisawa K, Seino K, Ishikawa Y, Nozue M, Todoroki T, Fukao K. Impaired proliferative response of V α 24 NKT cells from cancer patients against α -galactosylceramide. *J Immunol* 2002;168:6494–9.
- [24] Ikarashi Y, Mikami R, Bendelac A, Terme M, Chaput N, Terada M, et al. Dendritic cell maturation overrules H-2D-mediated natural killer T (NKT) cell inhibition: critical role for B7 in CD1d-dependent NKT cell interferon γ production. *J Exp Med* 2001;194:1179–86.
- [25] Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L, Nakayama T, Taniguchi M, Wang CR, et al. Tracking the response of natural killer T cells to α glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med* 2000;192:741–54.
- [26] Benlagha K, Weiss A, Beavis A, Teyton L, Bendelac A. In vivo identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers. *J Exp Med* 2000;191:1895–903.
- [27] Matsuda JL, Gapin L, Baron JL, Sidobre S, Stetson DB, Mohrs M, et al. Mouse V α 14i natural killer T cells are resistant to cytokine polarization in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8395–400.
- [28] Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* 2001;413:531–4.
- [29] Sharif S, Arreaza GA, Zucker P, Mi QS, Sondhi J, Naidenko OV, et al. Activation of natural killer T cells by α -galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat Med* 2001;7:1057–62.
- [30] Hong S, Wilson MT, Serizawa I, Wu L, Singh N, Naidenko OV, et al. The natural killer T-cell ligand α -galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med* 2001;7:1052–6.
- [31] Hammond KJ, Poulton LD, Palmisano LJ, Silveira PA, Godfrey DI, Baxter AG. α 1 β -T cell receptor (TCR)⁺CD4⁻CD8⁻ (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J Exp Med* 1998;187:1047–56.
- [32] Shin T, Nakayama T, Akutsu Y, Motohashi S, Shibata Y, Harada M, et al. Inhibition of tumor metastasis by adoptive transfer of IL-12-activated V α 14 NKT cells. *Int J Cancer* 2001;91:523–8.
- [33] Wilson MT, Johansson C, Olivares-Villagomez D, Singh AK, Stanic AK, Wang CR, et al. The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10913–8.
- [34] Crowe NY, Uldrich AP, Kyparissoudis K, Hammond KJ, Hayakawa Y, Sidobre S, et al. Glycolipid antigen drives rapid expansion and sustained cytokine production by NK T cells. *J Immunol* 2003;171:4020–7.
- [35] Benlagha K, Kyin T, Beavis A, Teyton L, Bendelac A. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science* 2002;296:553–5.
- [36] Pellicci DG, Hammond KJ, Uldrich AP, Baxter AG, Smyth MJ, Godfrey DI. A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1⁻CD4⁺ CD1d-dependent precursor stage. *J Exp Med* 2002;195:835–44.
- [37] Kadowaki N, Antonenko S, Ho S, Risoan MC, Soumelis V, Porcelli SA, et al. Distinct cytokine profiles of neonatal natural killer T cells after expansion with subsets of dendritic cells. *J Exp Med* 2001;193:1221–6.
- [38] Singh N, Hong S, Scherer DC, Serizawa I, Burdin N, Kronenberg M, et al. Cutting edge: activation of NK T cells by CD1d and α -galactosylceramide directs conventional T cells to the acquisition of a Th2 phenotype. *J Immunol* 1999;163:2373–7.
- [39] Kitamura H, Ohta A, Sekimoto M, Sato M, Iwakabe K, Nakui M, et al. α -Galactosylceramide induces early B-cell activation through IL-4 production by NKT cells. *Cell Immunol* 2000;199:37–42.
- [40] Matsuda JL, Gapin L, Sidobre S, Kieper WC, Tan JT, Ceredig R, et al. Homeostasis of V α 14i NKT cells. *Nat Immunol* 2002;3:966–74.
- [41] Giaccone G, Punt CJ, Ando Y, Ruijter R, Nishi N, Peters M. A phase I study of the natural killer T-cell ligand α -galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 2002;8:3702–9.

資 料

脳ニューロステロイド作用をかく乱する環境ホルモン

川戸 佳

東京大学大学院・総合文化研究科・広域科学専攻

記憶学習の中枢である大脳の海馬を中心にすえて、神経伝達に対する女性ホルモンの作用と、環境ホルモンの攪乱作用を研究してきた。従来の神経内分泌学の常識では、ステロイドホルモンは性腺や副腎皮質で合成されて、血流に乗って標的である脳（特に性中枢である視床下部など）に到達して作用する、というふうに信じられてきた。これに対して我々は新しい展開として、(A) 記憶を司る海馬は独自にチトクロム P450 系が女性・男性ホルモンを合成し、(B) これらは神経伝達や神経シナプス回路の配線を 1 時間ほどで急性的に変動させる、ことなどを明らかにした。(C) 環境ホルモンはこのような女性ホルモン作用に攪乱を与えると考え、研究を行ってきた。神経シナプス分泌学という概念に沿っている。

【脳でのエストロゲン合成】

放射性ステロイド基質を成獣 12 週齢ラットの海馬スライスに添加して代謝解析を行った。代謝産物は、HPLC を用いて分離し解析した。この結果、コレステロール→プレグネノロン→DHEA→アンドロステンジオール→テストステロン→エストラジオールに到る、女性ホルモン合成経路を発見した。更に、テストステロン→ジヒドロテストステロン→ $3\alpha,5\alpha$ -アンドロスタンジオールという男性ホルモンの代謝経路も確認した。♂海馬内に存在する脳ステロイドの濃度は、LC/MS/MS を用いて質量分析で決定した。この結果、テストステロン 17 nM, エストラジオール 20 nM というように海馬内の濃度が求まった。精巣摘出ラットでも海馬内のテストステロンやエストラジオールの濃度は 5-20 nM の値を示した。血中のテストステロン濃度は精巣摘出でゼロになるので、血中のステロイドの寄与は少ない。また以上の性ホルモン合成活性は、♂と♀の海馬に顕著な差が小さく、♂も女性ホルモンを合成し、♀も男性ホルモンを合成する。P450arom KO mouse が脳では wild mouse より多くの女性ホルモンを生産しているという、不思議な現象もわかってきた。

女性・男性ホルモン合成を行う酵素系は、各蛋白質の抗体組織染色や Western Blot による同定を行なった。StAR, チトクロム P450_{sc}, P450(17 α), P450arom などの酵素蛋白は CA1, CA3 領域の錐体神経細胞と DG 領域の顆粒神経細胞に局在していた。抗体の存在しない 5 α -reductase, 17 β -HSD, 3 β -HSD などは、RT-PCR による酵素の mRNA の同定を行ってその存在を見つけた。これ等の酵素の存在量は副腎皮質や精巣の 500 分の一程度と、予想どおり低かった。しかし体の内分泌器官と異なり、海馬では同一の神経内やごく近傍で局所的に働けば良いことを考えると、500 分の一の量でも十分であると思われる。内分泌器官

のようにステロイドを血液中に放出して標的細胞に到達させるという、内分泌機能を行う必要はないからである。

更に、中心的なステロイド合成酵素 P450(17 α), P450arom を、電子顕微鏡を用いて金コロイド免疫抗体染色像を観察することで調べた結果、CA1,CA3 の錐体神経細胞と DG の顆粒神経細胞のシナプス部分に存在していることを発見した。これは、性ステロイドが記憶を貯蔵する神経シナプスで局所的に合成されることを示している。

【脳のエストロゲン受容体・シナプス局在受容体】

数十分以内で起こる早い記憶学習に影響を及ぼす女性ホルモンの作用部位は、神経膜か神経シナプスに存在するエストロゲン受容体であると予測して、研究を行った。海馬の神経はエストラジオールの作用を大きく受けるが、未だ世界的に、成獣ラットで海馬の神経細胞においてエストロゲン受容体が存在するという明確な証明がなかった。数少ないインターニューロンにかろうじて ER α の抗体反応が認められるという報告が多い。我々は、記憶機能において中心的役割を果たす、数の多いグルタミン酸神経細胞での存在を解析を行った。その結果、これまで世界中で使用されてきた著名な ER α の抗体（例えば MC-20 抗血清）は、不純抗体を多く含む抗血清として使用されており、卵巣や脳視床下部で染色すると 67 kDa の ER α に反応するが、海馬・大脳皮質・小脳などの ER α が極めて少ない部位では、ER α とうまく反応せず、未同定の蛋白に結合してしまうという事実を、Western Blot や ER α KO マウスを用いて発見した。MC-20 は ER α KO マウスでも同じ 62 kDa バンドに反応する。従ってこれまでに発表されている多くの論文は、海馬スライスの組織染色、免疫電子顕微鏡観察、単離した培養神経細胞などで、ER α の分布に関して深刻な間違いを含んでいる。我々はエストロゲン受容体 ER α の新しい高純度精製抗体 RC-19 を新たに作成することで、問題を解決できた。RC-19 抗体を用いると、ER α は CA1-CA3 の錐体神経細胞と DG の顆粒神経細胞に分布することが示された。電子顕微鏡による免疫金抗体染色の解析を行って、錐体神経細胞と顆粒神経細胞のシナプス前部・後部と核に ER α が確かに局在していることを発見した。これは、エストラジオールと環境ホルモンが作用する受容体が神経シナプスに存在することを示している。

【脳でのエストロゲン作用】

神経シナプス伝達・記憶学習の環境ホルモンによる攪乱は、シナプス局在 ER α に環境ホルモンのビスフェノール A (BPA) やジエチルスチルベストロール (DES) などが作用する結果起こると想定して、電気生理やスパイン解析を行った。環境ホルモンは、体から入って、脳に移行する。ラットやサルに注入した BPA は、30 分から 1 時間程度で脳血液関門を越えて脳内に移行することが、CREST 内分泌の井口チームの研究などで確認されているからである。脳内に入った環境ホルモンは、薬物代謝酵素が極めて少ないため、代謝されにくいと考えられる。これ等の結果から、我々人や哺乳動物の脳に、環境ホルモンが到