

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

MR 1 拘束性 T 細胞 (M A I T 細胞) を介した
多発性硬化症の予防と治療に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山村 隆

平成19年 (2007) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- MR1 拘束性 T 細胞 (MAIT 細胞) を介した多発性硬化症の予防と治療に関する研究
国立精神・神経センター研究所 山村 隆 ----- 1

II. 分担研究報告

- MR1 拘束性 T 細胞を介した多発性硬化症動物モデル抑制に関する研究
国立精神・神経センター研究所 山村 隆 ----- 9
- 自己免疫と MR1 拘束性 T 細胞に関する研究
国立精神・神経センター-神経研究所 三宅 幸子 ----- 13
- Invariant V α 19 TCR 発現細胞の機能を介した自己免疫性神経疾患治療のための基礎研究
三菱化学生命科学研究所 島村道夫 ----- 18
- AIRE 分子欠損マウスの開発と供給および胸腺上皮細胞の役割に関する研究
徳島大学分子酵素学研究センター 松本 満 ----- 25
- 多発性硬化症の免疫制御機能の解析に関する研究
国立精神・神経センター-神経研究所 荒浪 利昌 ----- 28

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 32

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 33

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総括研究報告書

MR1 拘束性 T 細胞 (MAIT 細胞) を介した多発性硬化症の予防と治療に関する研究

主任研究者：山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第六部部长

研究要旨

T 細胞抗原受容体(TCR) のアルファ鎖として $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ 固定鎖を有し MR1 分子に拘束された T 細胞 (MR1 拘束性 T 細胞) は、消化管粘膜固有相に集積し、腸内細菌依存性に発生するユニークな細胞集団である。我々は、MR1 拘束性 T 細胞は自己免疫病発症を抑制する重要な免疫制御細胞であり多発性硬化症 (MS) の予防・治療戦略を策定する際に、同細胞に関する基盤研究が重要であることを指摘してきた。近年、我が国において西欧型 MS の顕著な増加傾向が見られるが、我々は腸内環境の変化による同細胞の機能的変調が一因であるという仮説を提唱している。多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) は $V\alpha 19$ $J\alpha 33$ TCR のトランスジェニック ($V\alpha 19$ Tg) マウスでは軽症化することを明らかにしてきた (Nature Immunology 7: 987-94, 2006)。本年は、精製した B 細胞と MR1 拘束性 T 細胞の共培養の実験により、MR1 拘束性 T 細胞の発現する CD278 分子 (inducible T-cell costimulator; ICOS) と B 細胞の発現する CD275 分子 (ICOSL, B7-RP1) の相互作用を介して IL-10 を産生することを証明した。また、 $V\alpha 19$ $J\alpha 33$ TCRTg マウスの EAE 抑制に伴って、B 細胞の IL-10 発現亢進の存在することを示した。同細胞の研究を格段に進歩させるためには、解析に有用な試薬や抗体の開発が重要である。そこで MR1 欠損マウスを免疫する方法によって、 $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ 固定鎖を認識するモノクローナル抗体の作製作業を進めた。 $V\alpha 19$ Tg マウスでは I 型アレルギー様免疫応答誘導時の血清中の IgE レベルの上昇は野生型マウスに比べて抑制されていた。また遅延型過敏症誘導モデルでも $V\alpha 19$ Tg マウスでは症状が抑制され、血清中炎症性サイトカインの上昇も抑制されていた。以上から $V\alpha 19$ NKT 細胞の免疫ホメオスタシス維持機能が示唆され、この細胞の機能調整に基づく自己免疫性神経疾患制御の有効性が支持された。

分担研究者

三宅 幸子 国立精神・神経センター
神経研究所免疫研究部 室長

松本 満 徳島大学分子酵素学研究センター
教授

島村 道夫 三菱生命科学研究所
発生免疫研究ユニットリーダー

荒浪 利昌 国立精神・神経センター
神経研究所免疫研究部 室長

A. 研究目的

T 細胞抗原受容体(TCR) のアルファ鎖として V α 19-J α 33 固定鎖を有し MR1 分子に拘束された T 細胞 (MR1 拘束性 T 細胞) は、消化管粘膜固有相に集積し、腸内細菌依存性に発生するユニークな細胞集団である (Treiner et al. 422:164, 2003)。我々は、同細胞が MS の脳内に浸潤していること、MS の動物モデル EAE を抑制する活性を持つことなどを示し (Croxford et al. Nature Immunology 7:987, 2006)、自己免疫病発症を抑制する重要な免疫制御細胞として認識されなければならないことを指摘して来た。すなわち我々は、多発性硬化症 (MS) の予防・治療戦略を策定する際に、同細胞に関する基盤研究はきわめて重要な意味を持つものと考えている。近年、我が国において西欧型 MS の顕著な増加傾向が見られるが、これは腸内環境の変化による同細胞の機能的変調が一因であるかもしれない。

本研究の最終目標は、MS の病態における MR1 拘束性 T 細胞の役割を明らかにし、同細胞を標的とした予防・治療法を開発することであり、残りの二年間で画期的な成果を上げたいと考えている。

本年度は、MR1 拘束性 T 細胞が自己免疫病 EAE を抑制するメカニズムを明らかにするため、精製した B 細胞と MR1 拘束性 T 細胞の共培養の実験系を構築して細胞間相互作用を解析した (山村)。V α 19J α 33 TCR のトランスジェニック (V α 19 Tg) マウスを用いて、同細胞が免疫ホメオスタシスで果たす役割を明らかにする研究を進めた (島村)。さらに、この分野の研究を格段に発展させるために、同細胞を認識するモノクローナル抗体の作製にも取りかかった (三宅)。

また、NKT 細胞発生との関連が疑われている

AIRE 遺伝子の欠損マウスを用いて、AIRE と免疫制御機構の関係に関わる研究を進めた (松本)。

以上の研究をヒト MS の研究に応用するために、患者末梢血リンパ球の免疫学的解析の準備を進めた (荒浪)。

B. 研究方法

B-1 MR1 拘束性 T-B 細胞間相互作用の解析

脳炎惹起性の myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)35-55 ペプチドで免疫した B6 マウスまたは V α 19 Tg マウスから、脾臓細胞を分離し、AutoMACS によって B 細胞を精製した。MR1 拘束性 T 細胞を過剰に発現する V α 19 Tg マウスを、さらに CD1d 欠損マウスに交配し、CD1d 拘束性 NKT 細胞は欠損し MR1 拘束性 T 細胞のみが過剰に発現するマウス (V α 19 Tg x CD1d KO) を作製した。このマウスの脾臓細胞から CD3+NK1.1+細胞 (=MR1 拘束性 T 細胞) をセルソーターで分離して、先に分離した B 細胞と 1:4 の比率で共培養した。そこに ICOSL に対する抗体を添加して、阻害効果を確認した。培養上清中の IL-10 は ELISA によって測定した。

B-2 V α 19TCR 抗体の作製

免疫原として、V α 19-J α 33 T 細胞受容体の CDR3 領域と同じアミノ酸配列をもつ V α 19 ペプチド (CAVKD SNYQLIWGACG) を合成した。さらに CDR3 領域のループ構造に近い構造をとらせるために、合成ペプチドの N 末と C 末のシステイン残基 (下線太字) 同士をジスルフィド結合させ、環状ペプチドにした。環状ペプチドをキャリアタンパク質となる KLH (keyhole limpet hemocyanin) と反応させ、これをアジュバントと混合することにより、免疫原とした。

また、V α 19-J α 33 T 細胞受容体を発現する T 細胞ハイブリドーマ NB116 (BW5147 細胞 H-2k; Thy-1.1, AKR/J 由来胸腺腫由来) をマウスに四回腹腔内投与した。その後、さらに細胞を二回静脈内投与し追加免疫を行った。細胞融合の親株としては、P3U1 細胞を用いた。スクリーニングには、ペプチドに対する反応を ELISA 法で測定することと、NB116 を染色しうるかどうかについて、flowcytometry を用いて解析した。

B-3 MR1 拘束性 T 細胞過剰発生の病態モデルへの影響

I 型アレルギーモデルとしてヤギ抗マウス IgD 抗血清あるいは FCA と混合した OVA を、V α 19 Tg マウスまたは対照 B6 マウスに投与し、血清免疫グロブリンを経時的に ELISA 法で測定した。

IV 型アレルギーモデルとして遅延型過敏症 (DTH) を誘導した。マウスをヒツジ赤血球で感作し、足蹠への抗原の皮下注射後の腫脹を測定した。またリウマチ性関節炎誘導性の II 型コラーゲンで感作した V α 19 Tg マウスおよびそのリッターメイト (B6 x DBA/1 F1) から脾臓細胞を採取し、これの培養下での抗原再刺激に伴う炎症性サイトカインの産生を測定した。

B-4 その他

分担研究報告所に記載された通り。

(倫理面への配慮)

実験動物は各施設の実験動物委員会の指針を遵守し、苦痛を最小限度に止めるよう配慮してこれを取り扱った。遺伝子組み換え実験はカルタヘナ法に基づき定めた各研究所の規定を遵守して行った。

C. 研究結果

C-1 MR1 拘束性 T-B 細胞間相互作用の解析

Tg x CD1d KO から分離した MR1 拘束性 T 細胞を、MOG35-55 感作脾臓細胞から精製した B 細胞と共培養した。その結果、IL-10 産生が誘導されたが、抗 ICOSL 抗体の添加によって完全に阻害された。EAE を発症している B6 マウスおよび Tg マウスの脾臓から B 細胞、T 細胞を分離して、その細胞表面抗原やサイトカイン分子の発現を測定した。その結果、Tg マウスでは B 細胞の IL-10 発現低下が見られた。なお IL-10 発現は T 細胞においてはきわめて弱いレベルであった。

C-2 V α 19TCR 抗体の作製

V α 19 ペプチドを免疫した MR1 欠損マウスより得た脾臓細胞を使って、細胞融合を行った。得られた細胞の培養上清を用いて、V α 19-J α 33 T 細胞受容体を発現する NB116 細胞との反応性を指標としたフローサイトメトリーによる一次および二次スクリーニングにより、NB116 細胞との反応性が高い抗体産生細胞を 5 クローン選別した。選別された 5 クローンの産生する抗体は、フローサイトメーター解析では二峰性染色パターンを示し、NB116 細胞上の V α 19-J α 33 T 細胞受容体とは異なる抗原に反応しているものと考えられた。

次に NB116 細胞を免疫した MR1 欠損マウスより得た脾臓細胞を使って、細胞融合を行った。HAT セレクションの後、得られた細胞の培養上清を用いて、NB116 細胞との反応性を指標としたフローサイトメトリーによる一次スクリーニングを行った。その結果、96 穴プレート 1920 well 中 803 well の培養上清に含まれる抗体が、NB116 細胞と反応することが明らかとなった。次に V α 19 ペプチドを用いた ELISA 法による二

次スクリーニングを行った。その中から 79 well を選別した。NB116 細胞は AKR/J 由来の胸腺腫細胞である (H-2k)。一方、免疫に用いた MR1 欠損マウスは C57BL/6 由来であるため、得られた抗体の中にはアロ抗原に対する抗体が多数含まれていることが予想された。また、T 細胞受容体が共通して有する領域を認識する抗体も除外する必要がある。そこで、NB116 細胞の他に、BW5147 細胞 (NB116 細胞作製に用いた親株細胞) と N38-3C3 細胞 (V α 14-J α 18 T 細胞受容体を発現する NKT 細胞ハイブリドーマ) の 3 種の細胞を用いて三次スクリーニングを行った。NB116 細胞に反応し、BW5147 細胞あるいは N38-3C3 細胞には反応しないことを選別の目安とした。その結果、上記の基準を満たすものとして 10 well が選別された。

C-3 MR1 拘束性 T 細胞過剰発生の病態モデルへの影響

Invariant V α 19-J α 33 TCR 発現細胞の免疫系調節機能を知るため、V α 19 Tg および遺伝背景の同じ正常マウスにおいて以下の検討を行った。

はじめにヤギ抗マウス IgD 抗血清、OVA 免疫による I 型アレルギーモデルを検討した。いずれの抗原についても、感作後の血清 IgE レベル上昇は、V α 19 Tg マウスにおいて抑制されていた。血清 IgG1 の上昇も Tg マウスで抑制されていたが IgG2a レベルは両者で差異が認められなかった。抗原投与によりもたらされる Th2 免疫反応の過剰を V α 19 Tg⁺細胞が抑制したことが推測された。

次にヒツジ赤血球で感作して誘導する遅延型過敏症(DTH)モデルにおいて V α 19 Tg マウスの免疫応答を検討した。足蹠への皮下注射による抗原の再投与後の腫脹は Tg マウスでは B6 マウスと

比較して抑制されていた。またこのときの血清 IFN- γ や IL-17 の上昇も同様に抑制されていた。B6 マウスにあらかじめ V α 19 Tg マウス細胞を養子移入しておくとも V α 19 Tg 同様 DTH は抑制された。DTH を CD1 遺伝子欠損の V α 19 Tg および non-Tg に対して誘導したときにも同様に Tg マウスでの抑制が観察された。

自己免疫関節炎を誘導する II 型コラーゲンで感作したマウスの脾臓細胞を抗原で再刺激したときの炎症性サイトカインの産生を測定すると、V α 19 Tg 細胞では non-Tg 細胞よりも特に IL-17 の産生が有意に抑制されていた。これらの結果から Th1/Th17 免疫反応の過剰を V α 19 Tg 細胞が抑制することが示唆された。

以上より V α 19 TCR 発現細胞は Th1/Th17 および Th2 免疫応答過剰モデルのいずれにおいても免疫ホメオスタシスの維持に関与していることが示唆された。

D. 考察

以上の研究から、生体内で MR1 拘束性 T 細胞が B 細胞と ICOS-ICOSL を介して相互作用を起こし、これが IL-10 産生を主体とする免疫制御につながることを確実にした。最近 IL-10 産生 B 細胞が自己免疫疾患の制御において重要な役割を果たすことが示唆されているが、B 細胞が制御性機能を発揮する際において MR1 拘束性 T 細胞が重要な役割を果たすことを示唆している。また、V α 19 TCR 発現細胞の免疫系ホメオスタシスの維持機能が、EAE 以外の様々な病態モデルにおいて示された。

これからの二年間で、MR1 拘束性 T 細胞を同定する抗体を確立し、マウスおよびヒトにおける同細胞の免疫制御機能の実態、それらの修飾

因子などについて、理解を深める必要がある。
また、同細胞の機能を修飾するリガンド分子を
明確にし、自己免疫疾患の治療薬として開発し
たいと考えている。

E. 結論

MR1 拘束性細胞はさまざまな病態モデルに
おいて、免疫調節細胞として免疫ホメオスターシ
スの維持に貢献する。EAE モデルにおいては、
MR1 拘束性細胞の発現する ICOS と B 細胞の発
現する ICOSL を介して直接に相互作用を起こし、
その結果産生される IL-10 を介して自己免疫を制
御する。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

I 論文発表

原著

- 1) Pyz E, Naidenko O, Miyake S, Yamamura T, Berberich I, Cardell S, Kronenberg M, Herrmann T. The complementarity determining region 2 of BV8S2 (V beta 8.2) contributes to antigen recognition by rat invariant NKT cell TCR. *J. Immunol.* 176(12): 7447-55, 2006
- 2) Miyamoto K, Miyake S, Mizuno M, Oka N, Kusunoki S and Yamamura T. Selective COX-2 inhibitor celecoxib prevents experimental autoimmune encephalomyelitis through COX-2 independent pathway. *Brain* 129: 1984-92, 2006
- 3) Croxford JL, Miyake S, Huang Y-Y, Shimamura M and Yamamura T. Invariant V α 19J α 33 T cells inhibit autoimmune inflammation. *Nat. Immunol.* 7(9):987-94, 2006
- 4) Aranami T, Miyake S and Yamamura T. Differential expression of CD11c by peripheral blood NK cells reflects temporal activity of multiple sclerosis. *J. Immunol.* 177(8): 5659-67, 2006
- 5) Shimamura, M., N. Okamoto, Y-Y. Huang, J. Yasuoka, K. Morita, A. Nishiyama, Y. Amano, and T. Mishina: Induction of promotive rather than suppressive immune responses from a novel NKT cell repertoire V α 19 NKT cell with α -mannosyl ceramide analogues consisting of the immunosuppressant ISP-I as the sphingosine unit. *Eur. J. Med. Chem.*, 41:569-576, 2006
- 6) Kinoshita, D., Hirota, F., Kaisho, T., Kasai, M., Izumi, K., Bando, Y., Mouri, Y., Matsushima, A., Niki, S., Han, H., Oshikawa, K., Kuroda, N., Maegawa, M., Irahara, M., Takeda, K., Akira, S., and Matsumoto, M. Essential role of I κ B kinase a in thymic organogenesis required for the establishment of self-tolerance. *J. Immunol.* 176: 3995-4002, 2006.
- 7) Niki, S., Oshikawa, K., Mouri, Y., Hirota, F.,

Matsushima, A., Yano, M., Han, H., Bando, Y., Izumi, K., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Kuroda, N., and Matsumoto, M. Alteration of intra-pancreatic target-organ specificity by abrogation of Aire in NOD mice. *J. Clin. Invest.* 116: 1292-1301, 2006.

総説

- 1) Yamamura, T.: Interleukin 17-producing T-helper cells and autoimmune diseases: Time for a paradigm shift? *Current Rheumatology Reports* (in press), 2007
- 2) Miyake, S. and T. Yamamura: NKT cells and autoimmune diseases: Unraveling the complexity. *Current Topics in Microbiology and Immunology* (in press)
- 3) Miyake S., and T. Yamamura: Therapeutic potential of CD1d-restricted invariant natural killer T cell-based treatment for autoimmune diseases. *Int Rev Immunol* (in press), 2007
- 4) 山村 隆: 第二のNKT細胞. 炎症と免疫. 15: 289-291, 2007
- 5) 三宅 幸子, 山村 隆: NKT細胞の糖脂質認識と免疫制御. 実験医学, 2007 (印刷中)
- 6) 荒浪 利昌, 山村 隆: NK細胞サブセットと難治性自己免疫疾患. 実験医学, 2007 (印刷中)

書籍

- 1) Yamamura, T.: Invariant NKT cells and immune regulation in multiple sclerosis. In

Immune Regulation and Immunotherapy in Autoimmune Disease. (Editor Jingwu Zhang). Springer, pp139-151, 2007

- 2) Miyake S., and T. Yamamura: Chapter 11 - CD1-restricted T Cells in Autoimmunity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Springer, 2007

- 3) 山村 隆: chapter 8. 神経免疫学序論 -自己免疫疾患とアレルギー-. 神経科学の最前線. Pp113-118, 培風館, 東京, 2006

- 4) Yamamura, T. and Aranami, T.: NK cells express a biomarker of multiple sclerosis CD11c. *Current Topics in Neuroimmunology*, Medimond Press, Italy, 2007

II 学会発表

国際学会 15 件

そのうち主なもの

- 1) Sakuishi K., Aranami T., Miyake S., Yamamura T. IL-2 costimulates IL-5 production by CD1d-reactive human CD4+ NKT cells: a novel pathway controlling NKT cell-mediated Th2 response. . Annual meeting of the American association of immunologists, Boston, May 14, 2006
- 2) Kaieda S., Oki S., Yamamura T., Miyake S. New synthetic glycolipid ligands for NKT-cells suppresses antibody-induced arthritis. 6th Annual Conference of FOCIS, San Francisco, June 2, 2006
- 3) Yamamura, T., J.L. Croxford and S.

Miyake: Invariant V α 19i T cells regulate autoimmune inflammation. Immunoregulatory role. The 4th International Workshop on CD1 and NKT Cells, Spineto Abbey, Tuscany, October 8, 2006

- 4) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M, Yamamura T. Invariant V α 19-J α 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulated inflammation in a model of multiple sclerosis. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 85 S1,p85, 2006)
- 5) Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T. Control of IL-5 production in CD1d-reactive human CD4+ NKT cell clones from MS patients following exogenous IL-2 co-stimulation. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 147 S1,p102, 2006)
- 6) Kaieda S, Oki S, Yamamura T, Miyake S. Activation of natural killer T cells with synthetic glycolipid suppresses antibody-induced arthritis. American College of Rheumatology 70th Annual Scientific Meeting, Washington, DC, November 13, 2006 (Arthritis Rheum. 54:S358, 2006)

国内学会 11件

そのうち主なもの

- 1) 山村 隆, J.L. Croxford, 三宅 幸子 : Invariant NKT細胞とMAIT細胞、臨床免疫

学会第34回総会, 東京, 10.1, 2006

- 2) 山村 隆: MR1 拘束性T細胞と自己免疫. 千里ライフサイエンスセミナー免疫・感染症シリーズ第1回「自己免疫疾患とその制御」, 大阪, 2.27, 2007
- 3) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M, Yamamura T: Invariant V α 19-J α 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulate inflammation in a model of multiple sclerosis. 第18回日本神経免疫学会学術集会、名古屋、3月2日、2006
- 4) 大塚敬男、三宅幸子、林幼偉、山村隆: 実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)におけるNeuropeptide Y (NPY)の役割 第47回日本神経学会、東京、5月13日、2006
- 5) 作石かおり、三宅幸子、山村隆: IL-2を介したCD4陽性NKT細胞クローンにおけるTh2サイトカインの選択的産生 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006
- 6) Lin Y, Croxford L, Miyake S, Yamamura T. Induction of adaptive regulatory T cells expressing CD103 besides CD25 and Foxp3 during recovery of EAE. The presence of suppressor epitope within encephalitogenic peptide. 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006
- 7) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M, Yamamura T. Invariant V α 19-J α 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulated inflammation in a model of multiple

sclerosis. 第 36 回日本免疫学会、大阪、12
月 11-13 日、2006

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

MR1 拘束性 T 細胞を介した多発性硬化症動物モデル抑制に関する研究

分担研究者 山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第六部部长

研究要旨

我々は T 細胞抗原受容体(TCR) のアルファ鎖として V α 19-J α 33 固定鎖を有し MR1 分子に拘束された T 細胞 (MR1 拘束性 T 細胞) が、自己免疫病発症を抑制する重要な免疫制御細胞であり、多発性硬化症の予防・治療戦略を策定する際に、同細胞に関する基盤研究が重要であることを指摘してきた。多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) は V α 19J α 33 TCR のトランスジェニック(Tg)マウスでは軽症化する。その作用機序として、MR1 拘束性 T 細胞と B 細胞の相互作用の結果、両細胞から産生される IL-10 が重要であることを示した。しかし、T 細胞、NK 細胞、マクロファージなどが混入した条件で得られた結果であり、MR1 拘束性 T 細胞および B 細胞以外の細胞が関与する可能性が否定できなかった。本年は、精製した B 細胞と MR1 拘束性 T 細胞の共培養の実験により、MR1 拘束性 T 細胞の発現する CD278 分子 (inducible T-cell costimulator; ICOS) と B 細胞の発現する CD275 分子 (ICOSL, B7-RP1) の相互作用を介して IL-10 を産生することを証明した。また、V α 19J α 33 TCRTg マウスの EAE 抑制に伴って、B 細胞の IL-10 発現亢進の存在することを示した。最近、B 細胞の IL-10 産生が自己免疫疾患の制御において重要であることが報告されている。MR1 拘束性 T 細胞は、その鍵を握る重要な細胞であることが明らかになった。

A. 研究目的

我々は、MR1 拘束性 T 細胞の過剰による自己免疫病 EAE の軽症化において、MR1 拘束性 T 細胞と B 細胞の相互作用の結果、両細胞から産生される IL-10 が重要であることを示した。しかし、これまでに行った研究は、T 細胞、NK 細胞、マクロファージなどが混入した細胞を用いており、MR1 拘束性 T 細胞および B 細胞以外の細胞が関与する可能性が否定できなかった。また、生体内で実際に B 細胞が MR1 拘束性 T 細胞と相互作用を起こし IL-10 を過剰産生するという証拠を欠いていた。本年は、精製した B 細胞と MR1 拘束性

T 細胞の共培養の実験により、他の細胞が関与するか否かを調べ、また EAE を誘導した野生型マウスと V α 19J α 33 TCR のトランスジェニック(Tg)マウスの脾臓 B 細胞を分離し、生体内で B 細胞が IL-10 を過剰産生している証拠を得る実験を行った。

B. 研究方法

脳炎惹起性の myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)35-55 ペプチドで免疫した B6 マウスまたは V α 19J α 33 TCR Tg マウスから、脾臓細胞を分離し、AutoMACS によって B 細胞を精製した。この細胞から RNA を精製し、定量的 RT-PCR に

よって IL-10 の発現量を測定した。

MR1 拘束性 T 細胞を過剰に発現する V α 19J α 33 TCR Tg マウスを、さらに CD1d 欠損マウスに交配し、CD1d 拘束性 NKT 細胞は欠損し MR1 拘束性 T 細胞のみが過剰に発現するマウス(Tg x CD1d KO)を作製した。このマウスの脾臓細胞から CD3+NK1.1+細胞をセルソーターで分離して、先に分離した B 細胞と 1:4 の比率で共培養した。そこに ICOSL に対する抗体を添加して、阻害効果を確認した。培養上清中の IL-10 は ELISA によって測定した。

C. 研究結果

Tg x CD1d KO から分離した MR1 拘束性を、MOG35-55 感作脾臓細胞と共培養すると、IL-10 産生が誘導されることを、これまで報告してきた。この反応は、抗 ICOSL (B7RP1) 抗体を添加することによって著明に抑制されるが、他の細胞間接着分子に対する抗体によって一部阻害を受けた。

今回 MOG35-55 感作脾臓細胞ではなく、さらに精製した B 細胞を用いた。その結果、IL-10 産生はやはり誘導でき、抗 ICOSL 抗体の添加によって完全に阻害された。抗 ICOSL 抗体に抗 CD86、抗 CD80、抗 CD154 などの細胞間相互作用阻害抗体を追加したが、抗 ICOSL 抗体単独による抑制効果以上の抑制は見られなかった。

EAE を発症している B6 マウスおよび Tg マウスの脾臓から B 細胞、T 細胞を分離して、その細胞表面抗原やサイトカイン分子の発現を測定した。その結果、Tg マウスでは T 細胞の VLA-4 発現が低下、および B 細胞の IL-10 発現低下が見られた。なお IL-10 発現は T 細胞においてはきわめて弱いレベルであった。

D. 考察

以上の研究から、生体内で MR1 拘束性 T 細胞が B 細胞と ICOS-ICOSL を介して相互作用を起こし、こ

れが IL-10 産生につながることを確実にした。最近 IL-10 産生性 B 細胞が自己免疫疾患の制御において重要な役割を果たすことが示唆されているが、今回の結果は、B 細胞が制御性機能を発揮する際において MR1 拘束性 T 細胞が重要な役割を果たすことを示唆している。

E. 結論

MR1 拘束性細胞は B 細胞と ICOSL-ICOS を介して直接に相互作用を起こし、自己免疫を制御する。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

I 論文発表

原著

- 1) Pyz E, Naidenko O, Miyake S, Yamamura T, Berberich I, Cardell S, Kronenberg M, Herrmann T. The complementarity determining region 2 of BV8S2 (V beta 8.2) contributes to antigen recognition by rat invariant NKT cell TCR. **J.Immunol.** 176(12): 7447-55, 2006
- 2) Miyamoto K, Miyake S, Mizuno M, Oka N, Kusunoki S and Yamamura T. Selective COX-2 inhibitor celecoxib prevents experimental autoimmune encephalomyelitis through COX-2 independent pathway. **Brain** 129: 1984-92, 2006
- 3) Croxford JL, Miyake S, Huang Y-Y, Shimamura M and Yamamura T. Invariant V α 19J α 33 T cells inhibit autoimmune inflammation. **Nat.Immunol.** 7(9):987-94, 2006

- 4) Aranami T, Miyake S and Yamamura T. Differential expression of CD11c by peripheral blood NK cells reflects temporal activity of multiple sclerosis. *J.Immunol.* 177(8): 5659-67, 2006

総説

- 1) Yamamura T: Interleukin 17-producing T-helper cells and autoimmune diseases: Time for a paradigm shift? *Current Rheumatology Reports* (in press), 2007
- 2) Miyake, S. and T. Yamamura: NKT cells and autoimmune diseases: Unraveling the complexity. *Current Topics in Microbiology and Immunology* (in press)
- 3) Miyake S, and T. Yamamura: Therapeutic potential of CD1d-restricted invariant natural killer T cell-based treatment for autoimmune diseases. *Int Rev Immunol* (in press), 2007
- 4) 山村 隆: 第二のNKT細胞. 炎症と免疫. 15: 289-291, 2007
- 5) 三宅 幸子、山村 隆: NKT細胞の糖脂質認識と免疫制御. 実験医学, 2007 (印刷中)
- 6) 荒浪 利昌、山村 隆: NK細胞サブセットと難治性自己免疫疾患. 実験医学, 2007 (印刷中)

書籍

- 1) Yamamura T: Invariant NKT cells and immune regulation in multiple sclerosis. In *Immune Regulation and Immunotherapy in Autoimmune Disease*. (Editor Jingwu Zhang). Springer, pp139-

151, 2007

- 2) Miyake S, and T. Yamamura: Chapter 11 - CD1-restricted T Cells in Autoimmunity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Springer, 2007
- 3) 山村 隆: chapter 8. 神経免疫学序論 - 自己免疫疾患とアレルギー. 神経科学の最前線. Pp113-118, 培風館, 東京, 2006
- 4) Yamamura T. and Aranami, T.: NK cells express a biomarker of multiple sclerosis CD11c. *Current Topics in Neuroimmunology*, Medimond Press, Italy, 2007

II 学会発表

国際学会 15 件

そのうち主なもの

- 1) Sakuishi K, Aranami S, Miyake S, Yamamura T. IL-2 costimulates IL-5 production by CD1d-reactive human CD4+ NKT cells: a novel pathway controlling NKT cell-mediated Th2 response. . Annual meeting of the American association of immunologists, Boston, May 14, 2006
- 2) Kaieda S, Oki S, Yamamura T, Miyake S. New synthetic glycolipid ligands for NKT-cells suppresses antibody-induced arthritis. 6th Annual Conference of FOCIS, San Francisco, June 2, 2006
- 3) Yamamura T, J.L. Croxford and S. Miyake: Invariant V α 19i T cells regulate autoimmune inflammation. Immuno-regulatory role. The 4th International Workshop on CD1 and NKT Cells, Spineto Abbey, Tuscany, October 8, 2006
- 4) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M,

Yamamura T. Invariant V α 19-J α 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulated inflammation in a model of multiple sclerosis. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 85 S1,p85, 2006)

- 5) Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T. Control of IL-5 production in CD1d-reactive human CD4+ NKT cell clones from MS patients following exogenous IL-2 co-stimulation. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 147 S1,p102, 2006)
- 6) Kaieda S, Oki S, Yamamura T., Miyake S. Activation of natural killer T cells with synthetic glycolipid suppresses antibody-induced arthritis. American College of Rheumatology 70th Annual Scientific Meeting, Washington, DC, November 13, 2006 (Arthritis Rheum. 54:S358, 2006)

国内学会 10 件

そのうち主なもの

- 1) 山村 隆, J.L. Croxford, 三宅 幸子: Invariant NKT 細胞と MAIT 細胞、臨床免疫学会第 34 回総会、東京、10.1, 2006
- 2) 山村 隆: MR1 拘束性 T 細胞と自己免疫. 千里ライフサイエンスセミナー免疫・感染症シリーズ第 1 回「自己免疫疾患とその制御」, 大阪, 2.27, 2007
- 3) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M, Yamamura T.: Invariant Va19-Ja33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulate inflammation in a model of

multiple sclerosis. 第 18 回日本神経免疫学会学術集会、名古屋、3 月 2 日、2006

- 4) 大塚敬男、三宅幸子、林幼偉、山村隆: 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) における Neuropeptide Y (NPY) の役割 第 47 回日本神経学会、東京、5 月 13 日、2006
- 5) 作石かおり、三宅幸子、山村隆: IL-2 を介した CD4 陽性 NKT 細胞クローンにおける Th2 サイトカインの選択的産生 第 36 回日本免疫学会、大阪、12 月 11-13 日、2006
- 6) Lin Y, Croxford L, Miyake S, Yamamura T. Induction of adaptive regulatory T cells expressing CD103 besides CD25 and Foxp3 during recovery of EAE. The presence of suppressor epitope within encephalitogenic peptide. 第 36 回日本免疫学会、大阪、12 月 11-13 日、2006
- 7) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M, Yamamura T. Invariant V α 19-J α 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulated inflammation in a model of multiple sclerosis. 第 36 回日本免疫学会、大阪、12 月 11-13 日、2006

Ⅱ. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

自己免疫と MR1 拘束性 T 細胞に関する研究

分担研究者 三宅 幸子 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部室長

研究要旨

MR1 拘束性 T 細胞は、可変性の限られた T 細胞受容体(TCR)を有し、炎症病変に集積してサイトカインを産生する MR1 拘束性のユニークなリンパ球である。昨年は、多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎が V α 19J α 33 TCR のトランスジェニック(Tg)マウスでは軽症で、V α 19J α 33T 細胞を欠く MR1^{-/-}では重症化することを示した。また、その作用機序として、V α 19J α 33 TCR Tg マウスにおいては B 細胞からの IL-10 産生が増加しており、ICOS 分子が IL-10 産生には重要であることを明らかにした。しかし、V α 19J α 33 T 細胞の生理的条件下での分布や挙動を検討するためには、V α 19J α 33 T 細胞を特異的に検出する方法が確立されていないため困難である。そこで本年度は、V α 19J α 33 TCR とヒトの対応細胞である V α 7.2J α 33 TCR に対する抗体の作製に取り組み、候補となる抗体を得た。

A. 研究目的

VMR1 拘束性 T 細胞は、可変性の限られた TCR を有し、MR1 拘束性のリンパ球である。これまでの研究で、多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎において、V α 19J α 33T 細胞は病態抑制に関与することを示した。また、その作用機序として、ICOS 分子を介した B 細胞からの IL-10 産生増加が重要であることを明らかにした。しかし、V α 19J α 33 T 細胞を特異的に検出する方法が確立されていないため、V α 19J α 33 TCR とヒトの対応細胞である V α 7.2J α 33 TCR に対する抗体の作製に取り組んだ。

B. 研究方法

V α 19TCR 抗体の作製には、V α 19J α 33 T 細胞が存在しない MR-1 欠損マウス(5週令の♂)を、免疫細胞として用いた。免疫原として、V α 19-J α 33 T 細胞受容体の CDR3 領域と同じアミノ酸配列をもつ V α 19

ペプチド(CAVKD SNYQLIWGACG)を合成した(J Exp Med 189, 1907 (1999)を参照)。さらに CDR3 領域のループ構造に近い構造をとらせるために、合成ペプチドの N 末と C 末のシステイン残基(下線太字)同士をジスルフィド結合させ、環状ペプチドにした。環状ペプチドをキャリアタンパク質となる KLH (keyhole limpet hemocyanin)と反応させ、これをアジュバントと混合することにより、免疫原とした。また、V α 19-J α 33 T 細胞受容体を発現する T 細胞ハイブリドーマ NB116 (BW5147 細胞 H-2k; Thy-1.1, AKR/J 由来胸腺腫由来)をマウスに四回腹腔内投与した。その後、さらに細胞を二回静脈内投与し追加免疫を行った。細胞融合の親株としては、P3U1 細胞を用いた。スクリーニングには、ペプチドに対する反応を ELISA 法で測定することと、NB116 を染色しうるかどうかについて、flowcytometry を用いて解析した。

C. 研究結果

V α 19 ペプチドを免疫した MR-1 欠損マウスより得た脾臓細胞を使って、細胞融合を行った。HAT セレクションの後、得られた細胞の培養上清を用いて、V α 19-J α 33 T 細胞受容体を発現する T 細胞ハイブリドーマ NB116 細胞との反応性を指標としたフローサイトメトリーによる一次スクリーニングを行った。その結果、1920 well 中 29 well の培養上清に含まれる抗体が、NB116 細胞と反応することが明らかとなった。拡大培養後に限界希釈法を用いてクローニングを行い、再度 NB116 細胞との反応性を指標とした二次スクリーニングを行った。その中から、特に NB116 細胞との反応性が高い抗体が存在する well を 5 well 選別した。選別された 5 well に含まれる抗体は、いずれも NB116 細胞との反応性を保っていたが、フローサイトメーター解析ではいずれも二峰性の染色パターンを示した。NB116 細胞は、V α 19-J α 33 T 細胞受容体を発現する均一な T 細胞ハイブリドーマであり、これらの抗体は NB116 細胞上の V α 19-J α 33 T 細胞受容体とは異なる抗原に反応しているものと考えられた。

次に NB116 細胞を免疫した MR-1 欠損マウスより得た脾臓細胞を使って、細胞融合を行った。HAT セレクションの後、得られた細胞の培養上清を用いて、V α 19-J α 33 T 細胞受容体を発現する T 細胞ハイブリドーマ NB116 細胞との反応性を指標としたフローサイトメトリーによる一次スクリーニングを行った。その結果、96 穴プレート 1920 well 中 803 well の培養上清に含まれる抗体が、NB116 細胞と反応することが明らかとなった。次に V α 19 ペプチドを用いた ELISA 法による二次スクリーニングを行った。その中から 450 nm の吸光度が 0.2 以上を指標に、79 well を選別した。NB116 細胞は AKR/J 由来の胸腺腫細胞で、MHC クラス I は H-2k である。一方、免疫に用いた MR-1 欠損マウスは C57BL/6 由来で MHC クラス I は H-2b であるため、得られた抗体の中にはアロ抗原に対する抗体が多数含まれていることが予想された。また、T 細胞受容体が共通して有する領

域を認識する抗体も、V α 19-J α 33 特異的ではないため除外する必要がある。そこで、NB116 細胞の他に、BW5147 細胞 (NB116 細胞作製に用いた親株細胞) と N38-3C3 細胞 (V α 14-J α 18 T 細胞受容体を発現する NKT 細胞ハイブリドーマ) の 3 種の細胞を用いて三次スクリーニングを行った。NB116 細胞に反応し、BW5147 細胞あるいは N38-3C3 細胞には反応しないことを選別の目安とした。その結果、上記の基準を満たすものとして 10 well が選別された。

D. 考察

今回、第二の NKT 細胞と言われる MR1 拘束性 T 細胞の特異的な検出を目的に、V α 19-J α 33 T 細胞受容体特異的抗体産生細胞の取得を試みた。最終的には、目的とする抗体の同定までには至らなかったが、候補となる複数の抗体産生細胞を得ることができた。まず V α 19 ペプチドを免疫した場合に得られた抗体は、V α 19-J α 33 T 細胞受容体陽性である NB116 細胞と均一に反応することができず、二峰性の染色パターンを示した。これは得られた抗体が、V α 19-J α 33 T 細胞受容体とは異なる他の細胞表面分子を認識しているものと考えられた。

次に、NB116 細胞を免疫した場合には、多段階のスクリーニングの末、最終的に 4 種類 20 クローンの抗体産生細胞を得ることができた。これらの細胞が産生する抗体は、少なくとも NB116 細胞のアロ抗原ではない細胞表面分子を認識し、そのエピトープは V α 19 ペプチドと高い相同性をもつが、T 細胞受容体の定常部ではないことが明らかとなった。今後、得られた抗体が、抗 V α 9-CDR3 モノクローナル抗体であることを示すためには、V α 19-J α 33 T 細胞を含むマウス由来 T 細胞を、抗体反応性の有無で 2 つの集団に分離し、それぞれの集団に含まれる V α 19-J α 33 遺伝子量を、定量 PCR 法などを用いて比較し、陽性群に V α 19-J α 33 遺伝子の集積が認められるかどうかを確認するとともに、免疫沈降などによって、認

識蛋白の同定が必要である。

2006

E. 結論

MR1 拘束性細胞であるマウス V α 19J α 33 TCR とヒト V α 7.2J α 33 TCR に対する抗体の候補を得た。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

I 論文発表

原著

- 1) Pyz E, Naidenko O, Miyake S, Yamamura T, Berberich I, Cardell S, Kronenberg M, Herrmann T. The complementarity determining region 2 of BV8S2 (V beta 8.2) contributes to antigen recognition by rat invariant NKT cell TCR. **J.Immunol.** 176(12): 7447-55, 2006
- 2) Miyamoto K, Miyake S, Mizuno M, Oka N, Kusunoki S and Yamamura T. Selective COX-2 inhibitor celecoxib prevents experimental autoimmune encephalomyelitis through COX-2 independent pathway. **Brain** 129: 1984-92, 2006
- 3) Croxford JL, Miyake S, Huang Y-Y, Shimamura M and Yamamura T. Invariant V α 19J α 33 T cells inhibit autoimmune inflammation. **Nat.Immunol.** 7(9):987-94, 2006
- 4) Aranami T, Miyake S and Yamamura T. Differential expression of CD11c by peripheral blood NK cells reflects temporal activity of multiple sclerosis. **J.Immunol.** 177(8): 5659-67,

総説

- 1) 三宅幸子 : iNKT 細胞 : 多彩な機能と病態への関与について **臨床免疫** 29(1): 27-36, 2006
- 2) 三宅幸子 : NKT 細胞 **分子リウマチ** 3(3): 26-33, 2006
- 3) 三宅幸子 : 多発性硬化症における免疫制御細胞の役割とその賦活法 **多発性硬化症研究・治療の現状 2006** 50(4): 636-643, 2006

II 学会発表

国際学会

- 1) Sakuishi K, Aranami S, Miyake S, Yamamura T. IL-2 costimulates IL-5 production by CD1d-reactive human CD4+ NKT cells: a novel pathway controlling NKT cell-mediated Th2 response. . Annual meeting of the American association of immunologists, Boston, May 14, 2006
- 2) Kaieda S, Oki S, Yamamura T, Miyake S. New synthetic glycolipid ligands for NKT-cells suppresses antibody-induced arthritis. 6th Annual Conference of FOCIS, San Francisco, June 2, 2006
- 3) Doi Y, Oki S, Satoh J-I, Aranami T, Miyake S, Yamamura T. NR4A2(Nurr1), an orphan nuclear receptor, is overexpressed in peripheral blood T lymphocytes of multiple sclerosis. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology.

178 S1,p78, 2006)

- 4) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M, Yamamura T. Invariant V α 19-J α 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulated inflammation in a model of multiple sclerosis. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 85 S1,p85, 2006)
- 5) Aranami T, Miyake S, Yamamura T. CD11c on NK cells mirrors the disease activity of multiple sclerosis. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 178 S1,p102, 2006)
- 6) Miyamoto K, Miyake S, Kusunoki S, Yamamura T. Selective COX-2 inhibitor celecoxib prevents experimental autoimmune encephalomyelitis through COX-2 independent pathway. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 117 S1,p117, 2006)
- 7) Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T. Control of IL-5 production in CD1d-reactive human CD4⁺ NKT cell clones from MS patients following exogenous IL-2 co-stimulation. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 147 S1,p102, 2006)
- 8) Oki S, Yamamura T, Miyake S. Natural killer T cell ligand OCH as a potential therapeutics for multiple sclerosis: Mechanism for OCH-induced TH2 polarization in vivo. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 148 S1,p102,

2006)

- 9) Lin Y, Miyake S, Yamamura T. Induction of adaptive regulatory T cells during recovery of EAE sensitized with PLP136-150 in SJL/J mice: The presence of suppressor epitope within PLP. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 151 S1,p102, 2006)
- 10) Nagayama S, Miyake S, Yamamura T. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of lymphokine-activated natural killer (NK) cells. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 169 S1,p102, 2006)
- 11) Kaieda S, Oki S, Yamamura T, Miyake S. Activation of natural killer T cells with synthetic glycolipid suppresses antibody-induced arthritis. American College of Rheumatology 70th Annual Scientific Meeting, Washington, DC, November 13, 2006 (Arthritis Rheum. 54:S358, 2006)

国内学会

- 1) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M, Yamamura T: Invariant V α 19-J α 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulate inflammation in a model of multiple sclerosis. 第18回日本神経免疫学会学術集会、名古屋、3月2日、2006
- 2) 海江田信二郎、大木伸司、山村隆、三宅幸子：NKT細胞活性制御作用を介した新規合成等脂質によるマウスモデル関節炎の抑制 第50