

回日本リウマチ学会、長崎、4月24日、2006

- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) Doi Y, Oki S, Miyake S, Yamamura T. Functional analysis of NR4A2, an orphan nuclear receptor, on the development of autoimmune encephalomyelitis. 第 36 回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006
- 8) Fujita M, Ootsuka T, Oki S, Mizuno M, Tomi C, Kaieda S, Miyake S, Yamamura T. Role of carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. 第 36 回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006
- 9) Tsukamoto K, Lin Q, Ohtsuji M, Nakamura K, Tsurui H, Miyake S, Yamamura T, Hirose S. Role of NKT cells in systemic lupus erythemaotus. 第 36 回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006
- 10) 海江田信二郎、水野美歩、大木伸司、坂口志文、坂口敦子、山村隆、三宅幸子：SSKG マウスにおける結核死菌投与による関節炎の誘導：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

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

「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」

分担研究者 島村道夫 三菱化学生命科学研究所 発生免疫研究ユニットリーダー

研究要旨

Invariant V α 19-J α 33 TCR α 鎖発現新規 NKT 細胞 (V α 19 NKT 細胞) の免疫制御機能に基礎をおく自己免疫性神経疾患治療法開発を目的として、引き続き V α 19NKT 細胞の抗原刺激に应答したサイトカイン分泌能、免疫系のホメオスタシス機能について検討した。V α 19NKT 細胞が過剰発生する invariant V α 19-J α 33 TCR α 鎖遺伝子導入 (V α 19 Tg) マウスでは平常時血清 IgE 濃度が野生型マウスより高いが I 型アレルギー様免疫応答を誘導するヤギ抗マウス IgD 抗血清や OVA を投与後の血清中の 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。一方細胞免疫性の遅延型過敏症誘導モデルでも V α 19 Tg マウスでは野生型マウスより症状が抑制され、このときの血清中炎症昂進性サイトカインの上昇は抑制されていた。同様に II 型コラーゲン投与したマウスの脾臓細胞の培養中での抗原再刺激による炎症昂進性サイトカインの産生は V α 19 Tg マウス細胞で抑制されていた。以上から V α 19 NKT 細胞の免疫系のホメオスタシス機能が示唆され、この細胞の機能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。

A. 研究目的

V α 19 NKT 細胞は TCR への刺激に应答して即時的に免疫系調節機能を持つ IL-4, IL-10, IFN- γ , IL-17 などのサイトカインを分泌する。またこれが引き金となり 2 次応答として周囲の細胞のサイトカイン分泌を誘導する。このことから V α 19NKT 細胞の免疫系制御機能が期待される。実際 V α 19NKT 細胞が過剰発生する invariant V α 19-J α 33 TCR α 鎖遺伝子導入 (V α 19 Tg) マウスでは多発性硬化症モデルと考えられる EAE を誘導したときに対照の野生型マウスと比べ病状の進行が抑制された (山村、三宅ら)。

このような抑制効果の詳細を知り難治性の自己免疫性神経疾患の治療法を開発するためにこの細胞の活性化に伴うサイトカイン、特に炎症昂進性の IL-17 の分泌機構を検討し、さらにこれらに基づく免疫系ホメオスタシス効果について検討を加えた。

B. 研究方法

(1) V α 19 NKT 細胞の IL-17 分泌機構

V α 19 Tg マウス (TCR C α 遺伝子欠損バックグラウンド), あるいは B6 マウスから肝臓単核球を密度勾配遠心法で調製し、これらを固相化抗 CD3 抗体 (2C11) 上で培養し、

上清を液性刺激因子として使用した。同様に脾臓単核球をこれらのマウスから調製してリスポンダー細胞とした。脾臓単核球の培養中に肝臓単核球培養上清を 1/2 量添加し、24 時間培養後の上清中の IL-17、IFN- γ を ELISA 法で定量した。このとき種々の因子やブロック抗体を共存させたときのサイトカイン分泌に対する影響を調べた。

(2) V α 19 TCR 発現細胞過剰発生の病態モデルへの影響

V α 19 Tg マウス (B6 バックグラウンド), 対照として B6 マウスの病態モデルにおける比較検討を行った。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 を投与後の血清イムノグロブリンレベルを経時的に ELISA 法で決定した。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。V α 19 Tg および non-Tg マウス (B6 バックグラウンドのリッターメイト) 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。細胞養子移入は Croxford らの方法 (発表論文 2) に従った。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の non-Tg マウス (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。

(倫理面への配慮)

実験動物は三菱化学生命科学研究所実験動物委員会の指針を遵守し、苦痛を最小限度に止めるよう配慮してこれを取り扱った。

遺伝子組み換え実験はカルタヘナ法に基づき定めた当研究所規定を遵守して行った。

C. 研究結果

(1) V α 19 Tg 細胞の IL-17 分泌機構

V α 19 NKT 細胞は TCR への刺激に応答して即時的に IL-17 を分泌した。このあと活性化された V α 19 Tg 細胞が分泌する液性因子により共存するナイーブ T 細胞の IL-17 分泌が誘導されることが示唆された。この機構を明らかにするために詳細な検討を加えた。

V α 19Tg マウス脾臓細胞をリスポンダーとしてこれの培養中に TCR 刺激した V α 19Tg マウス肝臓単核球細胞の培養上清を加えると IL-17 の分泌が新たに誘導される (図 1)。このとき IFN- γ の分泌はほとんど誘導されなかった。ここに抗 IL-23 抗体を共存させると IL-17 の分泌は部分的に 10-20 % だけ減少した。V α 19Tg マウス脾臓細胞培養系に培養上清のかわりに IL-23 を添加すると容量依存的に IL-17 の分泌が誘導され、抗 IL-23 抗体を共存させると IL-17 の産生誘導はほとんど抑制された。この IL-23 の IL-17 産生誘導効果は V α 19NKT 細胞に依存し、リスポンダー細胞からあらかじめ NK1.1⁺細胞を除去しておくとも IL-17 産生はほぼ消失した。したがって活性化した V α 19Tg 肝臓細胞培養上清中の IL-17 産生誘導因子の一つは IL-23 であることが示唆され、その機能発現には V α 19NKT 細胞の介在が必要であることがわかった。

V α 19Tg マウス脾臓細胞の培養中での

IL-17 の産生は TGF β 、IL-6 など他の液性因子の添加では誘導出来なかった。活性化 V α 19Tg 肝臓細胞培養上清の添加に抗 ICOS 抗体を共存させても効果はなかった。これらのことより上清中に含まれる IL-17 分泌誘導因子は Th17 細胞の分化を伴わない新規の経路を経由して効果がもたらされることが予測される。

(2) Invariant V α 19-J α 33 TCR 発現細胞の免疫系ホメオスタシス機能

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、この細胞が過剰発生する V α 19 Tg および遺伝背景の同じ正常マウスにおける免疫系病態モデルでの免疫応答について検討した。

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。いずれの抗原感作後の血清 IgE レベルも V α 19 Tg マウスにおいてその上昇が B6 マウスに比べ抑制されていた。このとき同時に測定した血清 IgG1 の上昇はやはり Tg マウスで抑制されていたが IgG2a レベルは両方で差異が認められなかった。これらのことから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示唆される。

次にヒツジ赤血球で感作して誘導する細胞免疫性の IV 型アレルギーに分類される遅延型過敏症(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(図2)。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 、

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, 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。

自己免疫性リウマチ性関節炎を誘導する II 型コラーゲンで感作したマウスの脾臓細胞を培養下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系ホメオスタシスに関与していることが示唆された。

D. 考察

多発性硬化症モデルの EAE では炎症促進性のサイトカイン IL-17 による患部炎症反応の進行が報告されている。以前から V α 19 Tg マウス細胞における IL-17 分泌促進が観察され、EAE モデルにおける V α 19 TCR 発現細胞の過剰発生による病状の抑制効果とどのように整合性を持たせるか、という課題があった。

V α 19 Tg 細胞の抗原刺激を引き金として即時的に V α 19NKT 細胞による IL-17 分泌がまず起こる。その後 V α 19Tg 細胞が分泌する液性因子のカスケードによる信号伝達によりエフェクター T 細胞による 2 次的な

IL-17 分泌が誘導される。この因子は B6 肝臓細胞の活性化によっても産生されるが、V α 19TCR 発現細胞の介在が IL-17 産生に至る信号伝達を有利にする。たとえば液性因子の一つとして候補にあがった IL-23 の作用は V α 19NKT 細胞に依存的であった。しかし IL-23 の効果は 2 次的な IL-17 分泌を部分的にしか説明できない。液性刺激因子として用いた V α 19 Tg 肝臓細胞培養上清中からは実効濃度の IL-23 は検出できなかった。他の因子を介する経路の存在が強く示唆され、これらの決定が今後の課題となる。

今回得られた免疫系病態モデルマウスでの V α 19 TCR トランスジーン導入の効果を検証した結果から V α 19 TCR 発現細胞の免疫系ホメオスタシス機能が示唆された。Th2 過剰病態モデルマウスにおける病状の抑制は、Tg マウス細胞の抗原刺激に伴う経時的な Th1/17 にシフトするサイトカインプロファイルにより説明可能だが、一方で Th1/17 過剰モデルでの病状抑制はこれとは矛盾する。抗原の再投与時における IL-17 産生のフィードバック効果によるものと思われる抑制が観察され、これが病状抑制と関連しているものと推察される。

現在 V α 19 TCR 発現細胞の発生が止まることが期待される J α 33 遺伝子欠損マウスの作成はターゲティングベクターで組み替えた ES 細胞からキメラマウスを作成したところまで進んだ。このマウスを対照とした実験により今回見出した V α 19 TCR 発現細胞の機能を明確に証明できると考えられる。

E. 結論

Invariant V α 19-J α 33TCR 発現細胞の免疫系ホメオスタシス機能がいくつかの免疫系病態モデルから示唆され、この細胞の EAE 抑制効果を裏付ける結果が得られた。これはこの細胞の自己免疫性神経疾患の治療のためのターゲットとしての有効性を示唆するものと考えられる。V α 19 TCR 発現細胞の抗原として α -Man 化糖脂質がスクリーニングされている。これをもとに今後実効性のある特異的活性化剤の設計が有効な治療法開発に必要となる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.

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

Eur. J. Med. Chem., 41:569-576 (2006)

2. Invariant V α 19/ T cells regulate autoimmune inflammation. J. Ludovic Croxford, Sachiko Miyake, Yi-Ying Huang, Michio Shimamura, and Takashi Yamamura

Nat. Immunol., 7:987-994 (2006)

2. 学会発表

1. 新規 $V\alpha 19$ NKT 細胞による炎症昂進性
IL-17 の分泌誘導 島村道夫
第36回日本免疫学会総会 大阪。

2. Invariant $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ T cells promote
ICOS-dependent IL-10 production by B cells
which regulate inflammation in a model of
multiple sclerosis.

J, Ludvic Croxford, Sachiko Miyake, Michio
Shimamura, and Takashi Yamamura

第36回日本免疫学会総会 大阪。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定
を含む)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

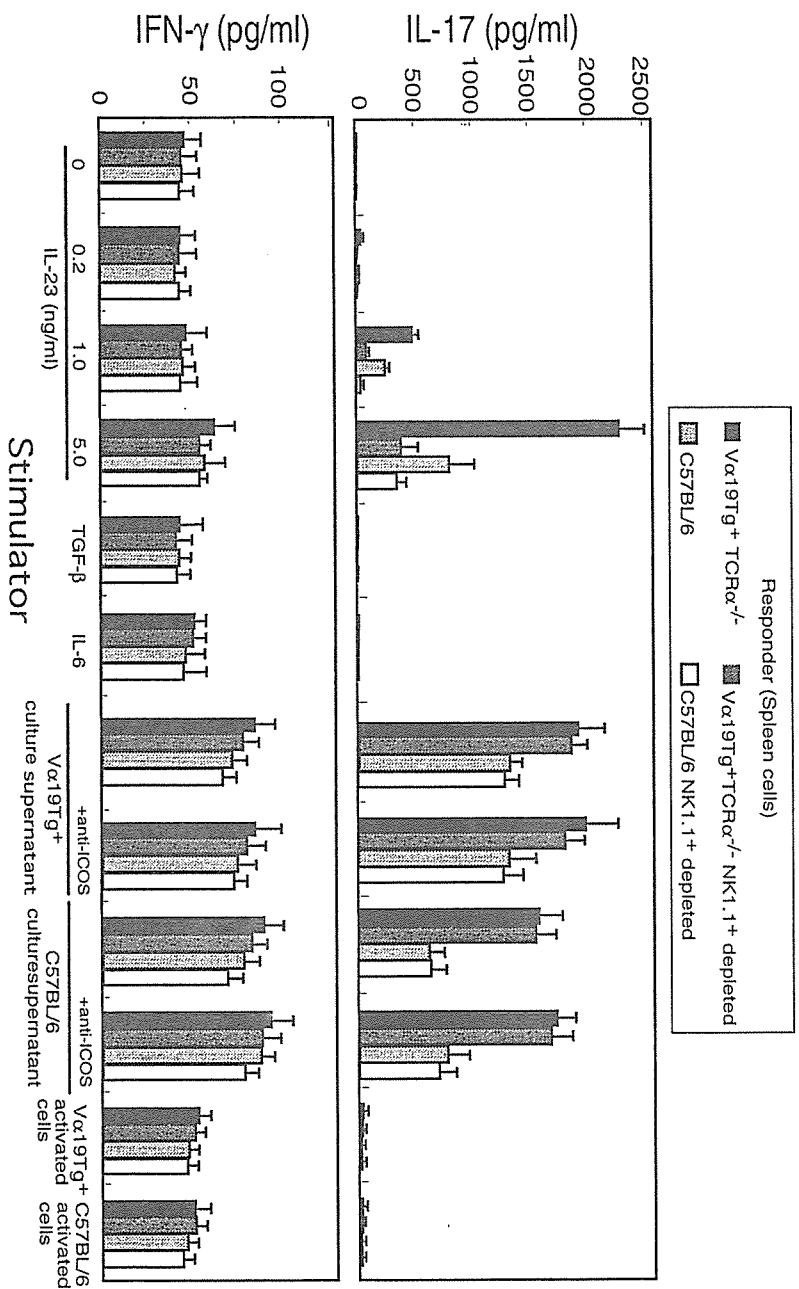


図 1 活性化T細胞の産生する液性因子によるVa19 Tg細胞に優先的なIL-17分泌誘導
 Va19 Tg、B6マウス脾臓細胞、およびそれぞれからあらかじめNK1.1陽性細胞を除去した
 ものをリスポンダー細胞とし、これにstimulatorとしてVa19 TgおよびB6マウス肝臓細胞
 を固相化抗CD3抗体上で培養した上清を添加し、24時間培養後の上清のサイトカインを
 ELISAにより測定した。対照としてリコンビナントIL-23、TGFβ、IL-6の添加の効果を調べた。

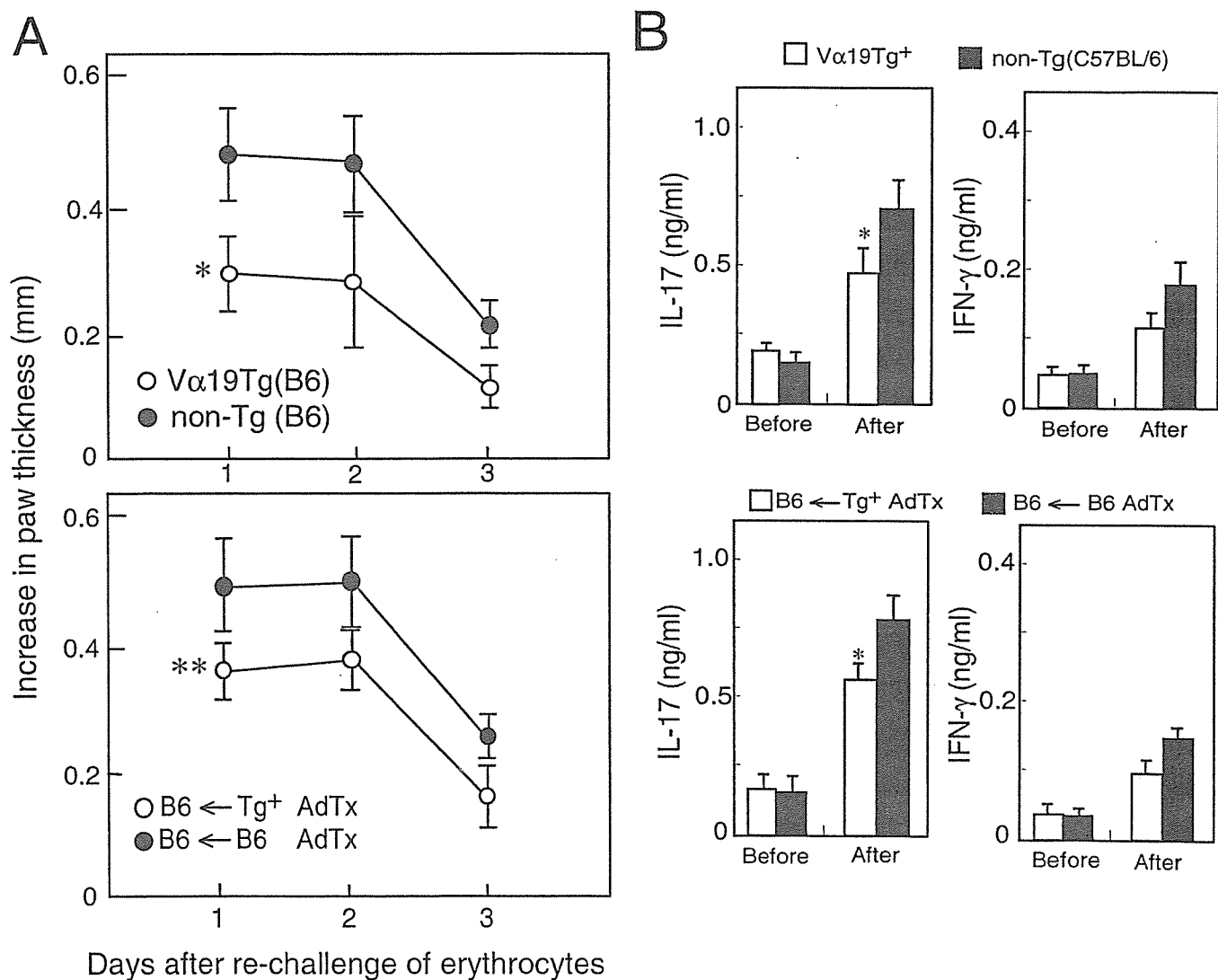


図2 遅延型過敏症誘導モデルマウスにおけるVα19 TCR トランスジーン導入の効果
Vα19 Tg、B6 マウス、Vα19 Tgマウス細胞を養子移入したB6 マウスに対しDTHを誘導した。

(A) ヒツジ赤血球で感作したマウスの足蹠皮下への抗原再注射後の腫脹を測定した。

(B) 足蹠への抗原皮下注射の前後の血清サイトカインをELISAで定量した。

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

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

（分担）研究者 松本 満 徳島大学分子酵素学研究センター

研究要旨

多発性硬化症をはじめとする種々の自己免疫疾患は、胸腺における自己寛容成立機構の破綻によって起こると考えられる。自己寛容の成立機構における胸腺上皮細胞の役割を胸腺上皮細胞で発現する 2 種類の転写調節因子（IKK α および AIRE）の遺伝子改変マウスを用いて解析した。その結果、IKK α と AIRE はともに免疫学的自己の表出過程に関与していると考えられたが、その分子機構は異なることが示唆された。本研究から、胸腺における自己寛容の成立には、胸腺上皮細胞内で多数の分子が異なる分子機構を用いて協調的に作用する必要があることが明らかになった。

A. 研究目的

多発性硬化症をはじめとする自己免疫疾患は原因不明の難病であり、現時点では原因に基づいた治療法が確立されていないため、数多くの患者の生命や生活が脅かされている。これまでの研究から、自己免疫疾患は胸腺における自己寛容成立機構の破綻によって起こると考えられている。自己寛容成立過程および自己免疫病態の発症過程では胸腺上皮細胞が重要な役割を担うと考えられるため、本研究では胸腺上皮細胞で発現する 2 種類の転写調節因子（IkB kinase α :IKK α および AIRE）の遺伝子改変マウスを用いて、自己免疫病態発症機構を解析した。とりわけ AIRE については、本遺伝子が自己免疫疾患の発症を規定するのみ

ではなく、臓器特異性にも関与することを I 型糖尿病のモデルマウスである NOD マウスに AIRE 欠損マウスを戻し交配して AIRE 欠損 NOD マウスを樹立して検討した。

B. 研究方法

IKK α 欠損マウスは頭蓋および四肢の形成不全によって生後 24 時間以内に死亡する。そのため、胸腺における IKK α の役割については胎齢 14.5 日目の胎仔胸腺を採取し、胸腺を欠損するヌードマウスの腎被膜下に移植し、レシピエントマウスの諸臓器の病理学的な解析を行うことによって実施した。AIRE 欠損 NOD マウスは既に樹立している。AIRE 欠損マウスを 10 代以上にわたり NOD マウスに戻し交配を行って樹立した。以上

の研究は、徳島大学遺伝子組換え実験安全管理委員会および徳島大学動物実験委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

IKK α 欠損マウス由来の胎仔胸腺を移植されたヌードマウスでは、肝臓や膵臓にリンパ球浸潤を主体とする自己免疫病態の発症を認めた。また、これらのヌードマウスの血清中には種々の臓器に対する自己抗体が高頻度に検出された。IKK α 欠損マウス由来の移植胸腺では免疫組織染色によって髄質構成細胞の発生障害を認めたことから、IKK α が自己抗原を発現する胸腺上皮細胞の発生・分化に必須の因子であることが明らかになった。さらに、IKK α 欠損胎仔胸腺の間質組織では NF- κ B2 の前駆体型 (p100) から成熟型 (p52) への processing が障害されていた。

他方、AIRE 欠損 NOD マウスでは NOD マウスにおける本来の標的組織である膵ラ氏島の破壊を認めなくなり、かわって外分泌組織である膵腺房細胞の著明な破壊像を認めた。この病理学的な所見に一致して、AIRE 欠損 NOD マウスは糖尿病の発症に対して抵抗性を獲得していた。また、AIRE 欠損 NOD マウスの血中に存在する自己抗体の対応抗原の一つを同定したところ、膵臓腺房細胞に発現する pancreas-specific protein disulfide isomerase (PDIp) であることが判明した。

D. 考察

IKK α 欠損マウス由来の胎仔胸腺移植によってレシピエントマウスに自己免疫病態が誘導でき、同時に IKK α 欠損胎仔胸腺間質組織では NF- κ B2 の processing 障害が認められた。これらの所見は、IKK α の上位に位置すると考えられる NF- κ B-kinase (NIK) 変異マウスにおいても我々は観察・報告している。このことから、胸腺上皮細胞内においては NIK-IKK α シグナル経路が胸腺上皮細胞の発生過程を制御しており、その障害が実際に自己免疫病態の発症に関わっていることが示唆された。今後は、NIK-IKK α シグナル経路によって制御される標的遺伝子の同定が必要である。

他方、AIRE を欠損させた NOD マウスにおける臓器特異性の変化は、AIRE が単に自己免疫病態の発症を規定するのみならず、どの臓器を標的として免疫破壊を行うかという、いわゆる臓器特異性の決定機構にも関与していることを明確に示した成績である。したがって、AIRE 欠損にともなう臓器特異性の変化がどのようなメカニズムによって起こるかを明らかにすることで、多彩な病状を示す自己免疫疾患の病態理解に貴重な情報が得られるものと思われる。また、本研究では AIRE 欠損 NOD マウスにおける自己抗原の一つとして PDIp を同定したが、AIRE 欠損 NOD マウス胸腺における PDIp の mRNA は低下しておらず、このことから AIRE 依存的自己免疫病態の発症には AIRE による PDIp 転写制御以外のメカニズムの存在が想定された。すなわち、AIRE は胸腺上皮細胞内で種々の自己抗原の転写レベルを制御す

るのみならず、抗原提示過程を制御している可能性が示唆された。なお、IKK α 欠損マウスと異なり、AIRE 欠損 NOD マウスの胸腺では免疫組織染色による検討では、胸腺上皮細胞の形成に特に異常を認めなかった。

E. 結論

2 種類の転写調節因子 IKK α と AIRE は、自己寛容の成立過程に関わる胸腺上皮細胞内で異なるメカニズムによって免疫学的自己の表出過程に関与していると考えられた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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 α in thymic organogenesis required for the establishment of self-tolerance.

J. Immunol. 176: 3995-4002, 2006.

2) 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.

2. 学会発表

1) 松本 満

自己免疫疾患の病態に働く胸腺上皮細胞における NF- κ B 活性化機構

シンポジウム・NF- κ B と炎症の分子生物学
第 27 回日本炎症・再生医学会 (東京)

平成 18 年 7 月 12 日

2) Han, H., Mouri, Y., Matsushima, A., Niki, S., Kuroda, N., and Matsumoto, M.

Stroma-dependent acinar cell

destruction in Aire-deficient NOD mice.

第 36 回日本免疫学会総会 (大阪)

平成 18 年 12 月 12 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生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

多発性硬化症の免疫制御機能の解析に関する研究

分担研究者：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

研究要旨

我々はこれまで、多発性硬化症（MS）寛解期に IL-5 産生亢進を特徴とする Type 2 ナチュラルキラー（NK）細胞が誘導され（Type2 NK 細胞偏倚）、調節性細胞として寛解の維持に積極的に関与している可能性を示してきた。最近マウス実験モデルにおいて、樹状細胞マーカーCD11c陽性NK細胞が、特異な機能を持つNK細胞亜分画として同定された。しかしこれまで、ヒト自己免疫疾患におけるこの細胞に関する報告は無い。本研究は、MS寛解期のCD11c陽性NK細胞の特徴を明らかにすることを目的とする。MS寛解期の一部の患者においてNK細胞CD11c発現亢進が認められた。発現亢進群CD11c^{high} MSのNK細胞は、CD11c^{low} MSに比べてHLA-DRを高発現しており、活性化状態にあることが示唆された。試験管内で種々のサイトカインによりNK細胞を刺激したところ、MSの疾患活動性との関連が示唆される、IL-15単独或はIL-12とIL-18の同時刺激によってのみ、CD11cの有意な発現上昇が誘導された。NK細胞調節能に重要なType2NK細胞偏倚は、CD11c^{low} MSでのみ認められた。さらに、CD11c^{high} MSは、採血より4ヶ月間の寛解率が、CD11c^{low} MSに比べ有意に低いことが判明した。以上より、NK細胞CD11c発現亢進は、Type2NK細胞偏倚の消失によるMSの疾患活動性増強を反映すると考えられる。

A. 研究目的

ナチュラルキラー（NK）細胞は腫瘍細胞やウイルス感染細胞を殺すリンパ球であるが、迅速なサイトカイン産生を介して、様々な免疫反応に関与していることでも知られる。近年、ヒトNK細胞が、サイトカイン産生能の異なる、type1およびtype2NK細胞へと分化しうることが報告されている¹。すなわち、IFN- γ 産生性type1NK細胞はIL-12により誘導され、IL-5、IL-13産生性type2NK細胞はIL-4により分化誘導される。我々はMS患者より分離したNK細胞が、IL-5産生亢進を示すことを見出した（type2NK細胞偏倚）²。このようなtype2NK細胞偏倚は、MS

の再発時には消失していることから、NK細胞が自己反応性Th1細胞に対して調節性細胞として働き、寛解期の維持に関与していると考えられる³。

MR1拘束性T細胞は、V α 19-J α 33のインバリアント鎖を発現するT細胞であり、ヒト及びマウスの腸管粘膜固有層に存在することから、mucosal-associated invariant T (MAIT) cellsとも呼ばれる。当研究室では、V α 19iトランスジェニックマウスにおいてV α 19i T細胞が多量のIL-10を産生し、実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）を抑制し、逆にV α 19i T細胞を欠損するマウスにおいてはEAEが増悪することを示し、

この細胞が EAE における重要な免疫調節性細胞であることを証明した⁴。

MS における MAIT 細胞と NK 細胞間の機能的関連の有無は不明であるが、いずれも免疫調節性細胞としての役割が示唆されることから、協調的に働いている可能性が考えられる。本研究は、MS における、NK 細胞および MAIT 細胞の関係性の解明を目的とする。今回は、その基礎データとしての、MS の病態と NK 細胞の機能的変化の解析を行った。

最近マウス実験モデルにおいて、樹状細胞 (DC) マーカー CD11c を発現する NK 細胞が、特異な機能を持つ、新たな NK 細胞サブセットとして同定された⁵。この細胞は、自己免疫マウスモデルにおいて調節性細胞として働くことが示唆された。しかしこれまで、ヒト自己免疫疾患における、CD11c 陽性 NK 細胞の機能は不明であった。本研究において我々は、MS 寛解期における CD11c 陽性 NK 細胞の細胞表面分子の表現型、機能解析を行い、MS の病態におけるこの細胞の役割を検討した⁶。

B. 研究方法

(1) 対象として、健常者 10 例と再発寛解型 MS 患者 25 例の末梢血単核球を用いた。全ての MS 患者は、採血の時点で最低 1 ヶ月間免疫抑制剤 (ステロイド、IFN- β) 投与を受けていないことを条件とした。

(2) T 細胞、NK 細胞表面分子の発現をフローサイトメトリーにより測定した。

(3) CD11c 発現上昇のメカニズムを明らかにするため、健常者の精製 NK 細胞を様々なサイトカイン存在下で 3 日間培養し、CD11c 発現量を解析した。

(4) 健常者、MS 患者それぞれから末梢血 NK 細胞を磁気ビーズを用いて分離し、定量的 RT-PCR 法により、IFN- γ 、IL-5 発現量を定量、Type2 NK 細胞偏倚を評価した。

(5) 採血より 120 日間の患者の臨床経過を追跡し、Kaplan-Meier の生存率に倣い、寛解率を算出した。統計学的検定は、Logrank テストで行った。

(倫理面での配慮)

本研究は、国立精神・神経センター倫理委員会の承認を受けており、また、全ての患者から書面によるインフォームドコンセントを得た上で採血を行った。また、患者から得られた情報は、当研究部でのみ使用し、厳重に保管されている。以上から、本研究は、倫理面への十分な配慮がなされている研究であると考えられる。

C. 研究結果

(1) MS 寛解期の NK 細胞では、健常者に比べ、CD11c 発現量 (平均蛍光強度、MFI) の有意な増加が認められた。MS 寛解期は、健常者 MFI の、(平均値 + 2x 標準偏差) を正常上限とすると、CD11c^{low} MS および CD11c^{high} MS に分けられた。

(2) NK 細胞の代表的活性化マーカーである、HLA-DR 発現を解析したところ、CD11c^{high} MS の NK 細胞において、健常者、CD11c^{low} MS の NK 細胞に比べて、有意な発現増強が認められた。

(3) MS の疾患活動性との関連が示唆される種々のサイトカインのうち、IL-15 或は IL-12+IL-18 のみが、NK 細胞 CD11c の有意な発現上昇を誘導した。

(3) CD11c^{low} MS の NK 細胞では、Type2 NK 細胞偏倚が認められたが、CD11c^{high} MS では、

認められなかった。

(4) CD11c^{high} MS は、4ヶ月間の寛解率が、CD11c^{low} MS に比べ有意に低いことが判明した。

(5) 寛解期に発現が上昇した CD11c は、再発時には有意に低下しており、NK 細胞 CD11c が MS の病態に従って、ダイナミックに変動することを示唆する。

D. 考察

(1) CD11c 発現上昇のメカニズムについては、NK 細胞活性化マーカー発現が、CD11c^{high} MS において有意に増強していること、また IL-15, IL-18, IL-12 によって CD11c 発現上昇が誘導されたことから、自己免疫反応の増強に伴って産生が増加した、これら炎症性サイトカインの刺激により、CD11c^{high} MS の NK 細胞における CD11c 発現上昇が誘導された可能性が考えられる。

(2) 上記の炎症性サイトカインの、NK 細胞 IL-5 発現に対する影響を解析したところ、これらの炎症性サイトカインにより NK 細胞の IL-5 発現は有意に低下した（データ示さず）。このことから、炎症性サイトカインの刺激により、NK 細胞 CD11c の発現上昇と Type2 NK 細胞偏倚の消失が誘導された可能性が考えられた。

(3) 重要なことに、このような NK 細胞の変化と MS の臨床経過の間に強い関連が見出された。CD11c^{high} MS の NK 細胞における Type2 NK 細胞偏倚の消失が、この群の早期の再発の一因となっている可能性が示唆された。

E. 結論

NK 細胞 CD11c は、MS の病態に従って、ダイナミックに変動し、寛解期の疾患活動性を反映することが示唆される。今後は、今回同定され

た MS 寛解期 2 群の個々の患者における MAIT 細胞の頻度を定量的 RT-PCR を用いて解析し、MS の病態の変化と NK 細胞、MAIT 細胞の関係性の解析を行う。

【参考文献】

1. Peritt, D., S. Robertson, et al. 1998. Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J. Immunol.* 161:5821-5824.
2. Takahashi, K., S. Miyake, et al. 2001. Natural killer type 2 bias in remission of multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 107:R23-29.
3. Takahashi, K., T. Aranami, et al. 2004. The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain.* 127:1917-1927.
4. Homann, D., A. Jahreis, et al. 2002. CD40L blockade prevents autoimmune diabetes by induction of bitypic NK/DC regulatory cells. *Immunity.* 16:403-415.
5. Croxford J. L., S. Miyake, et al. 2006. Invariant V(alpha)19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat. Immunol.* 7:987-994.
6. Aranami, T., S. Miyake, et al. 2006. Differential expression of CD11c by peripheral blood NK cells reflects temporal activity of multiple sclerosis. *J. Immunol.* 177:5659-5667.

F. 健康危険情報

G. 研究発表

I 論文発表

原著

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) 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. 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

- 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) Aranami, T., S. Miyake, and T. Yamamura. 2006. CD11c expression on peripheral blood NK cells is a disease biomarker reflecting activity of multiple sclerosis. 22nd Congress of the European Committee

for Treatment and Research in Multiple Sclerosis. Madrid, Spain. September 27-30.

- 2) Aranami, T., S. Miyake, and T. Yamamura. 2006. CD11c on NK cells mirrors the disease activity of multiple sclerosis. The 8th International Congress of Neuroimmunology. Nagoya, Japan. October 15-19.

国内学会

- 1) Sato, W., T. Aranami and T. Yamamura: Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5-phenotype. 第36回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 2006.12.12
- 2) Aranami, T., W. Sato, and T. Yamamura: CD28- T cells in multiple sclerosis might be derived from distinct precursors. 第36回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 2006.12.12

III. 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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
山村 隆	chapter 8. 神経免疫学序論 - 自己免疫疾患とアレルギー.	中村俊	神経科学の最前線	培風館	東京	2006	113-118
Yamamura, T	Invariant NKT cells and immune regulation in multiple sclerosis.	Jingwu Zhang	In Immune Regulation and Immunotherapy in Autoimmune Disease.	Springer	New York, USA	2007	139-151
Miyake S, and T. Yamamura	Chapter 11 - CD1-restricted T Cells in Autoimmunity.	Branch Moody	Current Topics in Microbiology and Immunology	Springer	New York, USA	2007	in press
Yamamura, T. and Aranami, T.	NK cells express a biomarker of multiple sclerosis CD11c.	Takeshi Tabira	Current Topics in Neuroimmunology	Medimond Press	Italy	2007	in press

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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 *
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 *
Croxford JL, Miyake S, Huang Y-Y, Shimamura M and Yamamura T.	Invariant V alpha 19/ T cells regulate autoimmune inflammation.	Nat. Immunol.	7(9)	987-94	2006 *
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 *
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 alpha 19 NKT cell with alpha-mannosyl ceramide analogues consisting of the immunosuppressant ISP-I as the sphingosine unit.	Eur. J. Med. Chem.	41	569-576	2006 *
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 B kinase in thymic organogenesis required for the establishment of self-tolerance.	J. Immunol.	176	3995-4002	2006 *
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 *
Yamamura, T.	Interleukin 17-producing T-helper cells and autoimmune diseases: Time for a paradigm shift?	Current Rheumatology Reports		in press	2007
Miyake, S. and T. Yamamura:	NKT cells and autoimmune diseases: Unraveling the complexity.	Current Topics in Microbiology and Immunology		in press	
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
山村 隆	第二のNKT細胞.	炎症と免疫	15	289-291	2007
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		印刷中	2007
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		印刷中	2007

★・・・IV.研究成果の刊行物・別刷に掲載

IV. 研究成果の刊行物・別刷

The Complementarity Determining Region 2 of BV8S2 (V β 8.2) Contributes to Antigen Recognition by Rat Invariant NKT Cell TCR¹

Elwira Pyz,^{2*} Olga Naidenko,[†] Sachiko Miyake,[‡] Takashi Yamamura,[‡] Ingolf Berberich,^{*} Susanna Cardell,^{3§} Mitchell Kronenberg,[†] and Thomas Herrmann^{4*}

Invariant NKT cells (iNKT cells) are characterized by a semi-invariant TCR comprising an invariant α -chain paired with β -chains with limited BV gene usage which are specific for complexes of CD1d and glycolipid Ags like α -galactosylceramide (α -GalCer). iNKT cells can be visualized with α -GalCer-loaded CD1d tetramers, and the binding of mouse CD1d tetramers to mouse as well as to human iNKT cells suggests a high degree of conservation in recognition of glycolipid Ags between species. Surprisingly, mouse CD1d tetramers failed to stain a discrete cell population among F344/Crl rat liver lymphocytes, although comprised iNKT cells are indicated by IL-4 and IFN- γ secretion after α -GalCer stimulation. The arising hypothesis that rat iNKT TCR recognizes α -GalCer only if presented by syngeneic CD1d was then tested with the help of newly generated rat and mouse iNKT TCR-transduced cell lines. Cells expressing mouse iNKT TCR reacted to α -GalCer presented by rat or mouse CD1d and efficiently bound α -GalCer-loaded mouse CD1d tetramers. In contrast, cells expressing rat iNKT TCR responded only to α -GalCer presented by syngeneic CD1d and bound mouse CD1d tetramers only poorly or not at all. Finally, CD1d-dependent α -GalCer reactivity and binding of mouse CD1d tetramers was tested for cells expressing iNKT TCR comprising either rat or mouse AV14 (V α 14) α -chains and wild-type or mutated BV8S2 (V β 8.2) β -chains. The results confirmed the need of syngeneic CD1d as restriction element for rat iNKT TCR and identified the CDR2 of BV8S2 as an essential site for ligand recognition by iNKT TCR. *The Journal of Immunology*, 2006, 176: 7447–7455.

The hallmark of invariant NKT cells (iNKT cells)⁵ is the expression of a TCR with characteristic invariant α -chain rearrangement and limited BV (V β) usage which recognizes glycolipids like α -galactosylceramide (α -GalCer) in a CD1d-restricted manner (1). Mouse iNKT TCR α -chains rearrange the variable gene 14 (AV14) and joining gene 18 (AJ18), which pair with β -chains of high CDR3 variability comprising BV8S2 and to lesser extent to BV7 or BV2 (2–4). The human iNKT TCR is composed of AV11/AJ18 (homolog of mouse AV14) α -chains paired with BV11 (homolog of mouse BV8) β -chains (2, 5). In the rat, homologous α -chain rearrangements have also been found (6). A contribution of iNKT cells in the control of tumors, infections,

and autoimmune diseases (reviewed in Refs. 7–9) has been demonstrated in many mouse models and by clinical observations in humans.

iNKT TCR ligands are endogenous or microbial glycolipids that are presented by the nonpolymorphic MHC class I-like molecule CD1d. Crystal structures of complexes of CD1d and glycolipid Ags have been reported very recently (10–12). Natural ligands are isoglobotrihexosylceramide (13) and α -anomers of various glycosphingolipids, which have been isolated from α -proteobacteria (14, 15). Other ligands activate only small subpopulations of iNKT cells. Their features are reviewed in Ref. 16. Still the most thoroughly characterized Ag of iNKT cells is the α -anomer of galactosylceramide (α -GalCer), which was originally isolated from a marine sponge. Essentially all iNKT cells respond to α -GalCer, and they can be visualized with α -GalCer-loaded CD1d oligomers (reviewed in Ref. 17). Of special importance to our study is the observation that α -GalCer-loaded mouse CD1d oligomers bind to human iNKT cells (18–20) and human CD1d tetramers stain mouse iNKT cells. Thus, it appears that ligand recognition is highly conserved throughout evolution (21).

The rat also expresses genes for CD1d (22, 23) and the AV14, AJ18 (6), and BV8S2 (24) gene segments, which are highly similar to those of the mouse (>80% sequence similarity of the translated products). Peculiar to the rat is the existence of a multimember AV14 gene family and the organ-specific preferences of certain AV14AJ18 rearrangements. Within the BN/SsNHsd genome, 10 AV14 genes have been identified (25), and analysis of F344/Crl rearrangements identified five AV14 family members, which based on CDR2 sequence similarity, have been divided into the type 1 and type 2 genes. Rearrangements of type 1 genes (AV14S1, AV14S2, AV14S4 (a pseudogene); and AV14S8, described in this paper) have been reported to be predominant within intrahepatic

¹Institute for Virology and Immunobiology, Würzburg University, Germany; ²Division of Developmental Immunology, La Jolla Institute for Allergy and Immunology, San Diego, CA; ³Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, Tokyo, Japan; and ⁴Immunology Section, Department of Cell and Molecular Biology, Lund University, Lund, Sweden

Received for publication January 3, 2006. Accepted for publication March 10, 2006.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by European Graduate College "Gene regulation in and by microbial pathogens" (to E.P. and T.H.) and by National Institutes of Health Grant AI 45053 (to M.K.).

² Current address: Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, Faculty of Health Sciences, Werner and Beit Building, South Groote Schuur Campus, Observatory, 7925, Cape Town, South Africa.

³ Current address: Department of Microbiology and Immunology, Göteborg University, Box 435, SE-405 30 Göteborg, Sweden.

⁴ Address correspondence and reprint requests to Dr. Thomas Herrmann, Institut für Virologie und Immunbiologie, Versbacherstrasse 7, 97078 Würzburg, Germany. E-mail address: herrmann-t@vim.uni-wuerzburg.de

⁵ Abbreviations used in this paper: iNKT cells, invariant NKT cells; α -GalCer, α -galactosylceramide; IHL, intrahepatic lymphocytes; MFI, mean fluorescence intensity.

lymphocytes (IHL), whereas rearrangements of the type II gene *AV14S3* are more frequently found in spleen, bone marrow lymphocytes, and thymocytes (6, 25). In all cases, either a G or an A have been found at position 93, located at the VJ junction (6), which is similar to the mouse, where mostly a G but also rarely A, V, or I are found in this region (2, 26).

Despite this information on the genetics, knowledge of the phenotype, function, and Ag recognition by rat iNKT TCR-bearing cells is rather limited. The comparison of NKR-P1A-positive rat T lymphocytes (6) with mouse NKT cells has elucidated some differences in terms of phenotype and functions. First of all, NKR-P1A (rat homolog of mouse NK1.1)-positive T cells found in spleen and liver (6, 27, 28) were of CD8 $\alpha\beta$ phenotype and showed no preferential BV usage. This is in stark contrast to the mouse, in which most of the NK1.1-positive T cells, and nearly all iNKT cells, are CD4⁺ or CD4⁻CD8⁻. Secondly, NKR-P1A-positive rat T cells produce IFN- γ but not IL-4 upon in vitro CD3 stimulation (28). Thus, it appears that these cells are not the equivalent of mouse iNKT cells.

Nevertheless, there is also evidence that favors the existence of typical iNKT cells in the rat. Matsuura et al. (6) showed that coculture of F344/Crl IHL with CD1d-transduced hepatocytes leads to the accumulation of cells with AV14 transcripts, and they identified AV14AJ18 rearrangements in a NKR-P1A^{high} subset of intrahepatic T lymphocytes of LEC rats (29). Additionally, another group has reported the generation of CD4⁺ or CD4⁻CD8⁻ NKR-P1A⁺ T cell clones from PVG rats that home to the liver and produce Th1 and Th2 cytokines (30). However, to our knowledge, α -GalCer reactivity of rat T lymphocytes or binding of α -GalCer-loaded CD1d oligomers have not been described yet. Both groups reported staining of the presumed rat iNKT cells by the BV8-specific mAb R78 (6, 30), which depending on the *Tcrb* haplotype binds to different rat homologs of mouse BV8S2. In F344/Crl rats (*Tcrb*^a haplotype), R78 reacts with BV8S4 (BV8S4A2) but not with BV8S2 (BV8S2A2), whereas in PVG rats (*Tcrb*^b haplotype) BV8S4 (BV8S4A1) is not functional and R78 Ab stains positively BV8S2 (BV8S2A1) (24, 31).

This paper describes our attempts to characterize F344/Crl rat iNKT cells, their phenotype, and their α -GalCer reactivity. Although like mouse NKT cells, the lymphocytes isolated from F344/Crl rat liver secreted cytokines upon α -GalCer in vitro stimulation, they could not bind α -GalCer-loaded mouse CD1d tetramers (mouse CD1d tetramers). To test the species specificity of recognition of α -GalCer-CD1d complexes, mouse and rat iNKT TCR were cloned, and a panel of cell lines expressing mouse and rat, wild-type or mutated iNKT TCR were generated. The AV14⁺ lines were tested for rat vs mouse CD1d-restricted α -GalCer recognition and for binding of mouse CD1d tetramers. The results confirmed the hypothetical species specificity of CD1d-dependent α -GalCer recognition by rat iNKT cells and allowed, for the first time, definition of the important role of the CDR2 β as a germline-encoded TCR region for this recognition.

Materials and Methods

Animals

C57BL/6 mice and LEW/Crl rats were bred in the animal facilities of the Institute for Virology and Immunology, University of Würzburg, Würzburg, Germany. F344/Crl rats were obtained from Charles River Wiga. All animals were maintained under specific pathogen-free conditions and were used at 6–10 wk of age.

Cell preparation and culture

Mouse and rat IHL were isolated using discontinuous Percoll (Pharmacia Biotech) gradients (40%/70% or 40%/80%) as described in Ref. 32. In both cases, liver was perfused with complete medium (via the portal vein) until

it became opaque. Then the organ was homogenized by passing through a metal mesh, and cells were washed with medium. Cells were resuspended in 40% isotonic Percoll solution and underlaid with 70 or 80% isotonic Percoll solution. After 25 min of centrifugation at 900 \times g at room temperature, mononuclear cells were isolated from the interface. Remaining erythrocytes were removed from the cell pellet by lysis with TAC buffer (Tris-ammonium chloride, 20 mM Tris (pH 7.2), 0.82% NH₄Cl). Thymocytes were isolated by passing the organ through a metal sieve followed by washing with complete medium. Primary cells and cell lines were cultured at 37°C with 5% CO₂ and H₂O-saturated atmosphere. Almost all cell types were cultured in RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies) supplemented with 5 or 10% FCS, 100 mM sodium pyruvate, 0.05% (w/v) glutamine, 10 mM nonessential amino acids, and 100 μ M 2-ME (Invitrogen Life Technologies). DMEM with the same supplements was used for transfection of 293T cells, conducted to produce retroviruses for gene transfer.

Cloning and expression of rat and mouse iNKT TCR

Rat AV14S8 α -chain was directly cloned from F344/Crl IHL cDNA, whereas the rat AV14S1 α -chain construct was generated using molecular biology methods. For the F344/Crl AV14S8 α -chain, RNA was isolated from cytoplasmic extracts of $\sim 10^6$ IHL following the protocol of the RNeasy MiniKit (Qiagen). The cDNA was synthesized according to the manufacturer's RT-PCR protocol supplied with a First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas). PCR was performed with HotStar DNA polymerase (Qiagen), using AV14-specific primers: (MWG-Biotech), rV α 14/1.2.3-Fow (5'-TTT GGG GCT AGG CTT CTG-3'), RC α end-STOP-Rev (5'-TCA ACT GGA CCA CAG CCT TAG CG-3'). PCR products were cloned into TOPO cloning vector (Topo pCR2.1-TOPO-TOPO TA Cloning Kit; Invitrogen Life Technologies) and sequenced using an ABI sequencer. Subsequently, rat AV14S8 α -chain DNA was ligated into *Eco*R1 sites of pzcCGZ5 IEGZ retroviral vector.

An AV14S1 α -chain with a V domain amino acid sequence described by Matsuura et al. (6) was generated using molecular biology methods. F344/Crl genomic DNA was amplified by PCR with rV α 14-*Eco*R1-Fow (5'-GGG CTA GAA TTC TGC AGA AAA ACC ATG GGG AAG C-3') and r/mV α 14Rev (5'-CAC CAC ACA GAT GTA GGT GGC AG-3') primers. This DNA was digested with *Eco*R1 and *Xba*I enzymes and gel purified. The resulting fragment, which encoded the leader and the first 72 aa of mature V region peptide, was coligated with a *Xba*I-F344/Crl cDNA-*Bam*HI fragment (encoding the J α terminus of another liver-derived α -chain) into the *Eco*R1/*Bam*HI sites of pzcCGZ5 IEGN vector, and the insert was sequenced. The generation of the rat BV8S2 β -chain and its mutants has been described elsewhere (33).

A mouse type I NKT cell TCR was cloned by RT-PCR from mouse KT12 hybridoma (34) using α -chain (mV α 14-*Eco*R1-Fow: 5'-GGG GAA TTC AAC CAT GAA AAA GCG CC-3'; and mC α 14-*Eco*R1-Rev: 5'-CCC GAA TTC CTC AAC TGG ACC ACA GCC-3') and β -chain (mV β 8.2-*Bam*HI: 5'-CGG GAT CCT GAG ATG GGC TCC AGG CTC TTC-3'; and mC β end-*Bam*HI: 5'-GGG GGA TCC TCA GGA ATT TTT TTT CTT GAC C-3')-specific primers. Mouse AV14S1A2 α -chain DNA was ligated into the *Eco*R1 site of pzcCGZ5 IEGN (containing genes for neomycin resistance and enhanced green fluorescence protein), and mouse BV8S2 β -chain DNA was ligated into *Bam*HI sites of pzcCGZ5 IEGZ (containing genes for zeozin resistance and enhanced green fluorescence protein) retroviral vectors (35).

Rat TCR α -chains (AV14S8 and AV14S1) as well as mouse AV14SA2-TCR α -chain were expressed together with C57BL/6 mouse or rat BV8S2 TCR β -chains in BW58r/mCD28 cells using a transient three-plasmid expression system. BW58r/mCD28 cells are BW58 TCR⁻ mouse hybridoma transduced with chimeric rat/mouse CD28 molecule (36). These cells are especially suitable for the analysis of Ag presentation by CD80-positive APC (33). Expression of transduced α -chains was estimated from the green fluorescence of the reporter gene. Cell surface expression of transduced TCR was analyzed by staining with anti-mouse CD3 mAb. When necessary to obtain similar levels of TCR expression, cell lines were sorted using a FACSVantage (BD Biosciences) machine or by coculture in selection medium containing 1 mg/ml neomycin (Invitrogen Life Technologies) or 250 μ g/ml zeozin (CAYLA), alternatively.

Cloning and expression of rat and mouse CD1d

P80rCD80 cells were transduced with mouse or rat CD1d. P80rCD80 cells are P80 cells (P815 mouse mastocytoma transduced with rat CD80; Ref. 37) which, to increase rat CD80 expression, were additionally infected with pzcCGZ5IZ or pzcCGZ5IEGZ retroviral vectors expressing genes for rat CD80 and zeozin resistance. These have been generated by RT-PCR from the CD80-containing BCMGSC⁺ vector (37) and subsequently cloned into the *Eco*R1 sites of both retroviral vectors. P80rCD80 cells transduced with