

Activation of NK cells by IFN- α/β or IL-12

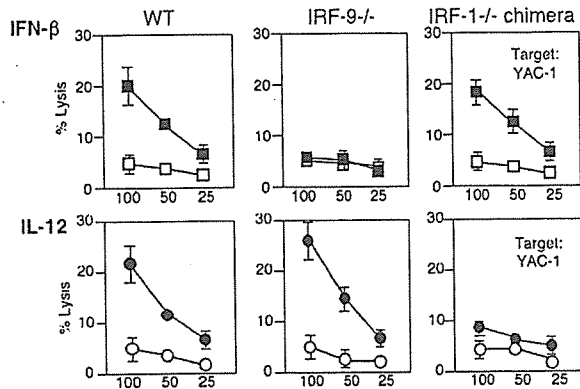


図2 インターフェロンとIL-12による細胞傷害活性の増強

WT, IRF-9^{-/-}, IRF-1^{-/-} NK細胞をインターフェロンあるいはIL-12により活性化させ、NK細胞活性を測定した。

Differential utilization of the IRF family transcription factors in the NK cell activation

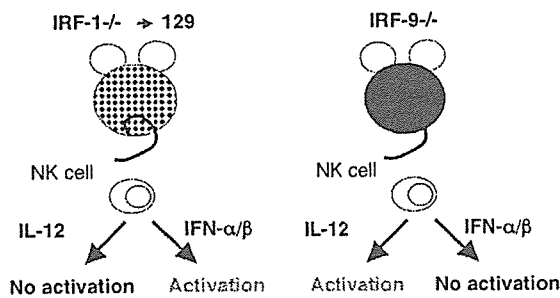


図3 IRF-1とIRF-9によるサイトカイン刺激による転写因子の使い分け

2) インターフェロンによるNK細胞認識機構の増強

インターフェロンによるNK細胞認識機構の増強を調べるため、NK細胞を*in vitro*でインターフェロンにより刺激後、NK活性化レセプターNKG2Dの発現を定量的PCR法により検討した。NKG2DはIFN- β 刺激により発現が増加することが判明し、インターフェロンにより、NK細胞の認識機構も増強することが明らかとなった。さらにNKG2DのリガンドであるRAE-1の発現制御機構は不明であり、これを追究するため、RAE-1 alpha, beta, gamma, delta, epsilonそれぞれのRNAを抽出し、5'-RACE法による実験

により、mRNAの先頭を決定し、databaseをもとに転写開始点を決定した。特にRAE-1 epsilonにはあらたなExonが存在することが判明した。

Increased NKG2D expression by IFN beta treatment

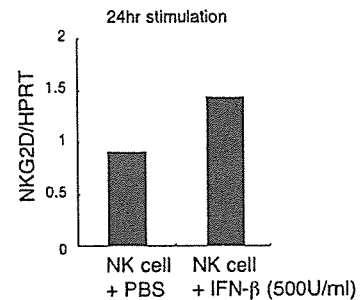


図4 インターフェロンによるNKG2Dの発現増強

D. 考察

本研究によりインターフェロンによるNK細胞の活性化機構が明らかとなった。IFN- β は、IRF-9を介してNK細胞を活性化させることが判明した。また、IRF-1はIFN- β のシグナルの下流で働いている可能性が高かったが、実際にはIRF-1よりIRF-9が重要な転写因子であることが明らかとなった。本実験により面白いことに、NK活性化のポジティブコントロールとして用いたIL-12による活性化にIRF-1が関与していることが明らかとなり、IL-12シグナルにおけるIRF-1の役割を発見することができた。

インターフェロンによるNK細胞の活性化は、NK細胞の認識機構の増強も一端を担っていることが明らかとなり、インターフェロンによりNK活性化レセプターNKG2Dの発現の増強が観察された。NKG2Dのリガンドについても我々は解析をすすめ、RAE-1 epsilonにあらたなExonがあることを突き止め、現在プロモーター解析を進めている。

E. 結論

我々は、インターフェロンによるNK細胞の活性化の分子機構について、シグナル伝達には、

転写因子IRF-9が必須であることを明らかにした。また、インターフェロンによるNK細胞の活性化は、NK細胞の認識機構の増強も一端を担っていること突き止め、NK活性化レセプターNKG2DがIFN- β により発現増強することを明らかにした。さらにNKG2Dリガンドの発現調節機構を探る目的で遺伝子構造解析をおこなっている。

参考文献

1. Trinchieri, G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47, 187-376 (1989).
2. Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A. & Tanaka, N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol* 19, 623-55 (2001).
3. Ogasawara, K. et al. Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice. *Immunity* 18, 41-51 (2003).
4. Ogasawara, K. et al. NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Immunity* 20, 757-67 (2004).
5. Lanier, L.L. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23, 225-74 (2005).
6. Ogasawara, K. & Lanier, L.L. NKG2D in NK and T cell-mediated immunity. *J Clin Immunol* 25, 534-40 (2005).
7. Ogasawara, K. et al. Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells. *Nature* 391, 700-3 (1998).

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ogasawara, K. & Lanier, L.L. NKG2D in NK and T cell-mediated immunity. *J Clin Immunol* 25, 534-40 (2005).
2. Fujiwara, N. et al. A novel avian homologue of CD72, chB1r, down modulates BCR-mediated activation signals. *Int Immunol* 18, 775-83 (2006).

2. 学会発表

1. 小笠原康悦 (シンポジウムI)
NODマウスの糖尿病発症におけるNK活性化レセプターの役割
第21回日本糖尿病動物研究会 2007年2月

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

Ⅲ. 班員名簿

難治性疾患の画期的診断・治療法等に関する研究

平成18年度班員名簿

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
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	部長
分担研究者	佐藤 準一	明治薬科大学薬学部生命創薬科学科バイオインフォマティクス	教授
	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
	小川 雅文	国立精神・神経センター武蔵病院神経内科	医長
	菊地 誠志	国立病院機構札幌南病院神経内科	医長
	横山 和正	順天堂大学医学部脳神経内科	講師
	野村 恭一	埼玉医科大学総合医療センター第四内科	教授
	太田 宏平	東京理科大学理学部教養	教授
	神田 隆	山口大学医学部脳神経病態学講座	教授
	楠 進	近畿大学医学部神経内科	教授
	堀 利行	京都大学大学院医学研究科	講師
	小笠原康悦	国立国際医療センター研究所難治性疾患研究部	室長
研究協力者	深澤 俊行	医療法人溪仁会 西円山病院	副院長
	大橋 高志	東京女子医科大学八千代医療センター神経内科	講師
	山脇 正永	東京医科歯科大学医学部臨床教育研修センター神経内科	助教授
	野原千洋子	都立荏原病院神経内科	医員

IV. 平成 18 年度班会議プログラム

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業

難治性疾患の画期的診断・治療法等に関する研究

(難治性神経疾患の画期的診断・治療法等に関する研究班)

主任研究者 山村 隆

平成18年度班会議

抄 録 集

日 時 : 平成18年12月15日 (金)

11:30～16:20

場 所 : 全共連ビル No.5 会議室

住 所 : 千代田区平河町2-7-9

電 話 : 03-5215-9501

班会議

11:30-12:00

班員連絡会議

12:00-13:00

昼食

13:00-13:40

セッション1) 多発性硬化症のバイオマーカー研究

座長: 佐藤 準一

1) 荒浪 利昌、山村 隆*

国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部

*国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第六部

「多発性硬化症寛解期ナチュラルキラー細胞のCD11c発現量は疾患活動性を反映する」
(20分)

2) 佐藤 準一*, 天竺桂 弘子、三澤 多真子

明治薬科大学薬学部生命創薬科学科バイオインフォマティクス、

*国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部

「MS再発寛解期の末梢血Tリンパ球で発現差異を呈する遺伝子群の分子ネットワーク解析」(20分)

13:40-14:30

セッション2) インターフェロン療法の効果発現に関する基盤研究

座長: 三宅 幸子

3) 藤田 伴子、内山 卓、堀 利行

京都大学大学院 医学研究科 血液・腫瘍内科学

「MSに対するIFN- β 療法の作用機序に関する免疫学的検討」(20分)

4) 神田 隆、佐野 泰照、清水 文嵩、前田 敏彦、中山 寛人、安部 真彰、鈴木 倫保*, 寺崎 哲也**

山口大学大学院医学研究科脳神経病態学神経内科学分野、*同脳神経外科学分野、

**東北大学大学院薬学研究科薬物送達学分野

「温度感受性SV40ラージT抗原を用いた新たなヒト*in vitro* BBB modelの確立」(15分)

5) 小笠原 康悦

国立国際医療センター研究所難治性疾患研究部 臨床免疫研究室
「インターフェロンとNK細胞」 (15分)

14:30-14:50
コーヒープレイク

14:50-15:25
セッション3) MS病態の基礎研究
座長: 山村 隆

6) 三宅 幸子、土居 芳充、大木 伸司*、山村 隆*
国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部
*国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第六部
「多発性硬化症における Nurr1 の関与」 (20分)

7) 菊地 誠志、宮崎 雄生*、新野 正明*、佐々木 秀直*、宮岸 隆司**、
深澤 俊行**、宮崎 晶子#、岩渕 和也##、小野江 和則##
国立札幌南病院神経内科、*北海道大学神経内科、**西円山病院神経内科、
#北海道大学眼科、##北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野
「食事性脂質とNKT, T細胞機能に関する研究」 (15分)

15:25-16:00
セッション4) インターフェロン療法とMSの臨床
座長: 神田 隆

8) 小川 雅文、山村 隆*
国立精神・神経センター武蔵病院 神経内科、
*国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第六部
「インターフェロン・ベータ 1b 療法中止後の多発性硬化症治療について」 (15分)

9) 横山 和正
順天堂大学医学部脳神経内科
「日本における運動障害 (movement disorder) を呈する多発性硬化症の特徴及び
インターフェロンの効果に関する研究」 (10分)

10) 太田 宏平、大橋 高志*、丸山 恵子*、清水 優子*、大原 久仁子*、岩田 誠*
東京理科大学 理学部、*東京女子医科大学神経内科
「外傷をきっかけにした白質病変」(10分)

16:00-16:20

セッション5) 免疫性神経疾患の治療法

座長: 楠 進

11) 富岳 亮*、滝澤 功一*、井口 貴子*、大貫 学*、高 昌星**、野村 恭一*
*埼玉医科大学 神経内科, 埼玉医科大学総合医療センター 神経内科
信州大学医学部保健学科生体情報検査学
「Arundic acidによる再発性EAEの抑制-臨床経過および病理組織学的検討-」
(10分)

12) 楠 進、宮本 勝一

近畿大学医学部神経内科

「実験的自己免疫性脳脊髄炎の中樞神経における aquaporin-4 の検討」(10分)

16:20 閉会の挨拶

多発性硬化症寛解期ナチュラルキラー細胞の CD11c 発現量は疾患活動性を反映する

主任研究者 山村隆¹⁾ 研究協力者 ○荒浪利昌²⁾

1) 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第六部

2) 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部

【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。我々はこれまで、多発性硬化症 (MS) 寛解期に IL-5 産生能の亢進を特徴とする Type 2 NK (NK2) 細胞が誘導され、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 (文献 1, 2)。最近、自己免疫疾患マウスモデルにおいて、樹状細胞マーカーの CD11c を発現し、特異な機能を持つ NK 細胞が同定され、調節性細胞である可能性が示唆された。しかしこれまで、ヒト自己免疫疾患における CD11c 陽性 NK 細胞に関する報告は無く、MS における重要性も不明である。本研究 (文献 3) は、MS 寛解期の CD11c 陽性 NK 細胞の特徴を解析し、NK 細胞の調節能との関連を明らかにすることを目的とする。

【方法】

対象は、MS 寛解期患者 (少なくとも 1 ヶ月間全ての免疫抑制剤の投薬なし) 25 例と年齢、男女構成比を合わせた健常者 10 例とした。末梢血単核細胞を蛍光標識抗 CD11c、CD3、CD56、HLA-DR 抗体等により染色し、フローサイトメトリーにより解析、CD3 陰性 CD56 陽性 NK 細胞上の細胞表面分子発現を測定した。CD11c 発現増加メカニズムの解析では、健常者末梢血より分離した精製 NK 細胞を、サイトカイン存在下で 3 日間培養した後、フローサイトメトリーで CD11c 発現量を比較した。NK 細胞における IL-5 の発現比較は、患者および健常者精製 NK 細胞から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法により行った。

【結果】

- (1) MS 寛解期の NK 細胞では、健常者に比べ、CD11c 発現量の有意な増加が認められた。MS 寛解期は、NK 細胞の CD11c 発現に従い、CD11c^{low} MS および CD11c^{high} MS に分けられた。
- (2) CD11c^{high} MS の NK 細胞は 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。
- (3) 健常者 NK 細胞を様々なサイトカイン存在下で培養したところ、IL-15 或は IL-12+IL-18 存在下でのみ、有意な CD11c 発現上昇を認めた。
- (4) CD11c^{low} MS の NK 細胞では、健常者のそれに比べ、IL-5 発現増加が認められたが、CD11c^{high} MS の NK 細胞では、IL-5 発現増加が認められなかった。
- (5) 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。

【考察】

MS 寛解期の NK 細胞における CD11c 発現上昇は、調節性 NK 細胞の NK2 フェノタイプ消失を示唆し、MS の疾患活動性を反映すると考えられる。NK 細胞の CD11c は、MS の病勢評価、再発予知、治療方針決定などに有用なバイオマーカーの一つとなり得ると考えられる。

【参考文献】

1. Takahashi, K., S. Miyake, T. Kondo, K. Terao, M. Hatakenaka, S. Hashimoto, and T. Yamamura. 2001. Natural killer type 2 bias in remission of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 107:R23-29.
2. Takahashi, K., T. Aranami, M. Endoh, S. Miyake, and T. Yamamura. 2004. The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain* 127:1917-1927.
3. Aranami, T., S. Miyake, and T. Yamamura. 2006. Differential expression of CD11c by peripheral blood NK cells reflects temporal activity of multiple sclerosis. *J Immunol* 177:5659-5667.

MS 再発寛解期の末梢血 T リンパ球で発現差異を呈する遺伝子群の分子ネットワーク解析

分担研究者 ○佐藤準一^{a,b} 研究協力者 天竺桂弘子^a、三澤多真子^a

^a 明治薬科大学薬学部生命創薬科学科バイオインフォマティクス

^b 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部

目的

多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は自己抗原反応性 T 細胞により惹起される時間的・空間的再発を特徴とする中枢神経系炎症性脱髄疾患である。回復期には髄鞘再生を認めるが、再発を反復し炎症が高度で遷延化することにより髄鞘再生不全・軸索傷害・神経変性を来して不可逆的な機能障害を残す。現在まで MS 再発予測法は確立されていない。もし事前に再発を予知出来れば、再発前から免疫調節薬を集学的に投与して、炎症を軽減し軽症化出来る可能性が高い。MS 寛解期と再発期では末梢血リンパ球遺伝子発現パターンに顕著な差異を認めると考えられる。本研究では MS 患者の末梢血リンパ球遺伝子発現プロフィールを経時的に DNA マイクロアレイで解析し、再発特異的遺伝子発現パターンを同定する。

方法

6 名の relapsing-remitting MS 患者で、神経内科専門医診断に基づく急性増悪期(acute relapse)と完全寛解期(remission)に末梢血リンパ球(peripheral blood mononuclear cells; PBMC)を採取、CD3+ T 細胞から RNA を分離、cDNA microarray (1258 genes; Hitachi Life Science)で遺伝子発現プロフィールを比較解析した。

結果

#1.再発期サンプル vs 寛解期サンプルの群間検定($p < 0.05$)で 43 遺伝子の発現差異(再発で上昇 18 遺伝子; 再発で低下 25 遺伝子)を認めた(表 1)。

#2. 43 遺伝子を discriminator gene とした階層的クラスタ解析では、再発期サンプルと寛解期サンプルは独立したクラスタに分離された。

#3. KeyMolnet[1]で 43 遺伝子から関連 88 分子を抽出し、分子ネットワーク解析を施行した(図 1)。共通上流検索(発現制御)および周辺検索(結合・発現制御・複合体形成)の両者とも NF- κ B による発現調節系の関与が示唆された。

考察

RRMS の末梢血 T 細胞で再発期・寛解期に発現差異を認める遺伝子群の分子ネットワーク解析では NF- κ B 遺伝子発現制御系異常の病態悪化への関与が示唆された。NF- κ B は proinflammatory cytokines の発現制御に重要な転写因子で、NF- κ B selective inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) *in vivo* 投与は EAE を抑制する[2]。また中枢神経系選択的 NF- κ B 発現抑制で EAE は軽症化する[3]。

結論

NF- κ B signaling pathway regulators は MS 再発予防薬創薬ターゲットとなると思われる。

文献

1. Sato et al. Curr Drug Discov Technol 2005; 2: 89-98.
2. Pahan et al. Neurosci Lett 2000; 287: 17-20.
3. Van Loo et al. Nature Immunol 2006; 7: 954-961.

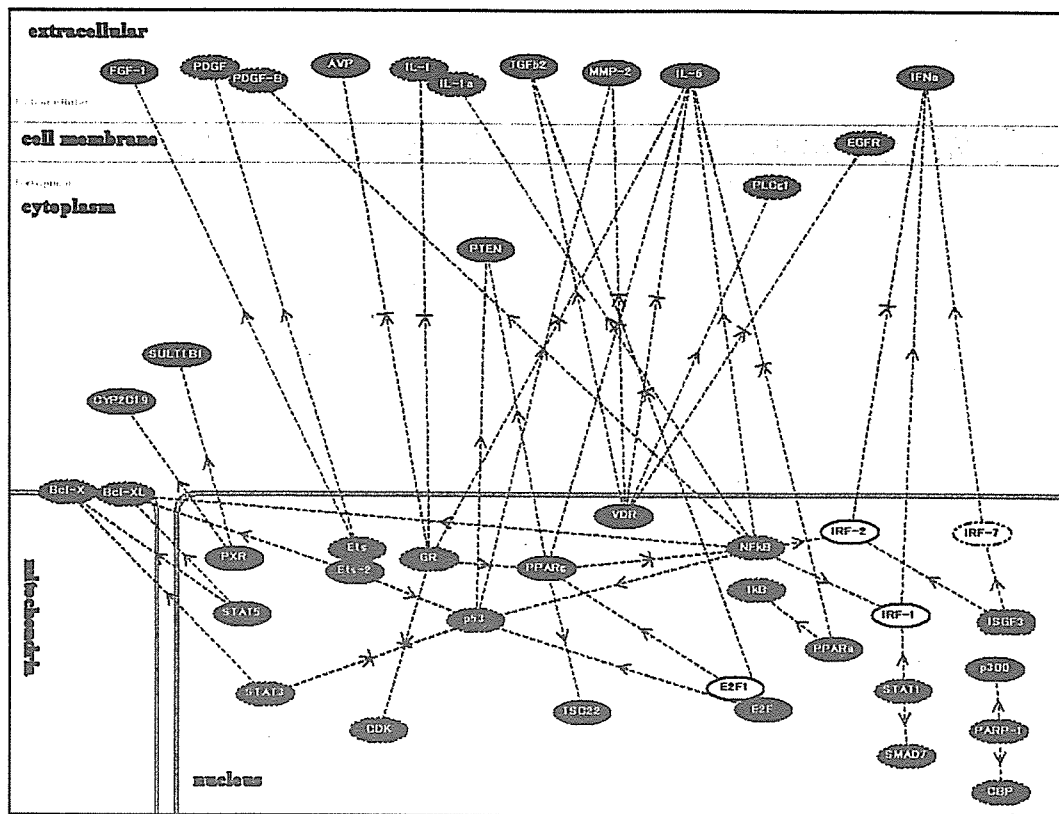


図 1. MS 再発・寛解で発現差異を認める 43 遺伝子の分子ネットワーク。

Rank	Symbol	GenBank	P-value	Regulation	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
						SULT1B1	NM_014465	0.0279	down																	
1	PPARG	NM_005037	0.000978	up		EP300	NM_001429	0.0286	down																	
2	RND3	NM_005168	0.00126	down		GJA4	NM_002060	0.0287	down																	
3	IL6	NM_000600	0.00197	down		PDGFB	NM_002608	0.0292	up																	
4	AKT2	NM_001626	0.00273	up		ARID4A	NM_002892	0.0305	down																	
5	DCC	NM_005215	0.0038	up		CYP2C19	NM_000769	0.0307	down																	
6	CREBBP	NM_004380	0.00605	down		FGF1	NM_000800	0.0317	down																	
7	ATF5	NM_012068	0.00699	down		MMP2	NM_004530	0.0327	up																	
8	PLCG1	NM_002660	0.00936	up		ARHGAP1	NM_004308	0.0335	down																	
9	CDK3	NM_001258	0.0101	up		TOP3B	NM_003935	0.0397	up																	
10	RIPK1	NM_003804	0.0115	up		SUB1	NM_006713	0.0433	down																	
11	TNFRSF4	NM_003326	0.0121	down		PRKCBP1	NM_183047	0.0434	down																	
12	ABCC9	NM_005691	0.014	down		TGFB2	NM_003238	0.0436	up																	
13	STAT2	NM_005419	0.0149	up		SMAD7	NM_005904	0.0437	down																	
14	PTEN	NM_000314	0.018	down		TCF4	NM_003199	0.044	down																	
15	AVP	NM_000490	0.0182	up		NOS1	NM_000620	0.0442	down																	
16	FADD	NM_003824	0.0193	up		TSC22D1	NM_183422	0.0454	down																	
17	ELF2	NM_006874	0.021	down		GNB1L	NM_053004	0.0457	down																	
18	NFKB2	NM_002502	0.0211	up		IFNA8	NM_002170	0.046	down																	
19	ERBB4	NM_005235	0.0218	down		IL1A	NM_000575	0.0477	up																	
20	BCL2L1	NM_001191	0.0253	up		CD3D	NM_000732	0.0492	up																	
21	BTRC	NM_003939	0.0265	up		IL1R1	NM_000877	0.0495	down																	

表 1. MS 再発・寛解で発現差異を認める 43 遺伝子。

MS に対する IFN- β 療法の作用機序に関する免疫学的検討

藤田伴子、内山 卓、○堀 利行

京都大学大学院 医学研究科 血液・腫瘍内科学

多発性硬化症 (MS) に対して IFN- β 療法が何故有効であるのか、そのメカニズムの詳細は依然として明らかでない。I 型 IFN (α , β , ω など) および II 型 IFN (γ) はいずれも免疫賦活作用があり、T 細胞応答を増強すると考えられてきた。しかし、Th1 型の臓器特異的自己免疫疾患である MS に対して IFN- β の投与が病態悪化を招来せず、むしろ病勢を抑えるという臨床成績は、このような IFN についての一般的な理解の妥当性について再考が必要なことを示している。最近、IFN の中でもとくに I 型 IFN には、単純に免疫を賦活するだけでなく、標的細胞や作用の時期によって免疫制御性の活性を合わせもつことが明らかになりつつある。

われわれが昨年度から行っている肥満細胞 (MC) と IFN- α に関する研究も、このような I 型 IFN の免疫制御作用の一端を明らかにすることを目指したものである。肥満細胞 (MC) が多発性硬化症 (MS) の動物モデルである experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) の発症、増悪に重要な役割を果たすことが報告されている。そこでわれわれは、臍帯血 CD34⁺ 造血幹細胞より *in vitro* で分化させて調整した肥満細胞 (MC) を用いて、Fc ϵ RI クロスリンク後の TNF- α 、IL-10 の産生、OX40L 発現および T 細胞増殖促進活性に対する IFN- α の影響について検討した。その結果、IFN- α の添加は、MC の生存や増殖には影響しなかったが、TNF- α 産生、OX40L 発現を抑制し、逆に IL-10 産生を増加させた。このような変化に一致して IFN- α で処理された MC は抗 CD3 抗体刺激 CD4⁺ T 細胞に対する増殖促進活性が低下していた。このことから、IFN- β を含む I 型 IFN が MC を介して MS の病態を緩和する方向に働くという仮説が成り立つ。

MC 以外に樹状細胞 (DC) に関しても同様の解析を行っている。2001 年に Ito らはヒト骨髄性 DC (myeloid DC, mDC) に $\text{INF-}\alpha$ を作用させると、IL-12 産生が低下し、逆に IL-10 産生が亢進すること、そしてこのことに対応して T 細胞を制御性 T 細胞 Tr に分化させることを報告した。この結果は、MS の $\text{INF-}\beta$ 療法の作用機序を考えるための重要な手がかりを含んでいると思われる。われわれは、ヒト mDC および plasmacytoid DC (pDC) を用いて同様の実験を行って彼らの実験結果を再現するとともに、EAE モデルにおいて病態形成に重要な役割を果たすことが知られている OX40L の発現について検討した。その結果、 $\text{INF-}\alpha$ は mDC および pDC に対していずれも OX40L の発現を増強することが判明した。IL-12 のない環境下での OX40 シグナルはナイーブ CD4 T 細胞を Th2 に分化させる方向に働くことが知られている。したがって、 $\text{INF-}\alpha$ により IL-12 産生を抑制された mDC に OX40L が発現した場合には、免疫応答を Th1 から Tr または Th2 にシフトさせる方向に働くと推測される。また、無刺激または IL-3 で培養した pDC は元来 Th2 誘導型とされており、OX40L はその方向をさらに増強する可能性がある。すなわち、I 型 INF は mDC および pDC いずれに対しても OX40-OX40L 系を介して Th1 免疫応答を制御する方向に作用することが示唆された。

以上の結果より、 $\text{INF-}\beta$ 療法の作用機序として、I 型 INF が DC および MC への免疫制御作用を介して MS の Th1 型免疫応答を抑制し治療効果を発揮するのではないかと考えられる。

温度感受性 SV40 ラージ T 抗原を用いた新たなヒト *in vitro* BBB

model の確立

分担研究者 神田 隆¹⁾

研究協力者 ○佐野泰照¹⁾, 清水文崇¹⁾, 前田敏彦¹⁾, 中山寛人¹⁾, 安部真彰¹⁾, 鈴木倫保²⁾, 寺崎哲也³⁾

1) 山口大学大学院医学研究科脳神経病態学神経内科学分野, 2) 同脳神経外科学分野, 3) 東北大学大学院薬学研究科薬物送達学分野

背景・目的

難治性自己免疫性脳疾患である多発性硬化症 (MS) においては, 末梢血に存在する活性化 T リンパ球や monocyte が血液脳関門 (BBB) を乗り越えて脳内へ侵入することが病態における重要なステップであると考えられている. 逆に, このステップを阻止できれば, MS の発症や病態の増悪を阻止でき, 有用な治療法となる可能性がある. この目的達成のためには, 末梢血白血球と BBB 構成内皮細胞との相互作用の解明が必要であるが, すぐれた *in vitro* BBB モデルが存在すれば, この目標への近道となりうる. 近年, *in vitro* BBB model のひとつとして温度感受性 SV40 ラージ T 抗原トランスジェニックラット由来の脳毛細血管由来内皮細胞株 (TR-BBB) が確立された. この TR-BBB では *in vivo* の BBB で発現している GLUT-1 や CRT といった influx transporter や p-gp, ABCG2 などの efflux transporter の発現が確認されている. ところが, BBB における tight junction において重要な働きを担っていると考えられている claudin-5 の発現が不十分であり, 十分なバリアー機能を持たないと最近報告された (Ohtsuki S et al. J Cell Physiol. 2007 Jan;210 (1):81-6. (online)) .

一方, これまでヒトの脳毛細血管内皮細胞株を用いた *in vitro* の実験系の報告は散見されるが, これらの内皮細胞はその characterization や purity の検証が十分とは言えず, *in vivo* の BBB の性質を保持したヒト *in vitro* BBB モデルの樹立が待たれていた.

今回, われわれは, 上記の諸問題を克服すべく, ヒト脳毛細血管内皮細胞由来の新たな *in vitro* BBB モデル作成を試みた.

方法

材料としてインフォームドコンセントが得られた脳腫瘍患者から摘出された正常大脳皮質の一部を用いた. 定法にて脳微小血管を分離し, 酵素処理ののち,

type I-collagen coated dish に播種した。播種して一週間後、増殖中の細胞群に温度感受性 SV40 ラージ T 抗原を組み込んだレトロウイルスを感染させた。

以後、内皮細胞の増殖とともに、ペリサイトや線維芽細胞などの非内皮細胞も次第に増殖してきたため、物理的に剥離除去した。その一方で、cloning cup を用いて純粋な内皮細胞のみが存在すると考えられる箇所を pick up し、継代を行った。3 回の継代により、ほぼ 100% の内皮細胞群を得た。分離された内皮細胞クローンが BBB モデルとして適切かどうかの characterization と、実際に温度感受性を有する株であるかどうかの検証を行った。

結果

得られた内皮細胞群はバリア構成内皮の特徴である spindle fiber shaped morphology を呈していた。位相差顕微鏡像および DiI-Ac-LDL の取り込み確認実験から、ほぼ 100% の内皮細胞集団であることが示された。得られた内皮細胞クローンはバリアー構成遺伝子である occludin, claudin-5, ZO-1, ZO-2 を発現していた。また GLUT-1, p-gp をはじめとする transporter も発現していた。加えて、Transendothelial resistance (TEER) の測定および、¹⁴C-inulin を用いた内皮細胞 monolayer における透過性の検証にてバリアー機能を有することが示された。さらに 33°C の培養温度条件下では 37°C に比し増殖が有意に速く、かつ数回の継代後も同様の増殖を示し、条件的不死化株の性質を有する細胞株であることが示された。

結論

ヒト脳微小血管内皮細胞由来条件的不死化細胞株の樹立に成功した。樹立した内皮細胞群は温度感受性を示すと同時にバリアー構成内皮としての性質をよく保持していた。この *in vitro* BBB model は BBB の生理機能の解明のみならず、MS をはじめとする難治性脳疾患の病態解明・治療法開発に有用なツールとなりうると考えられた。

「インターフェロンとNK細胞」

分担研究者：○小笠原康悦

国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部、臨床免疫研究室

IFN- β は多発性硬化症に対する治療薬として使われているが、IFN- β はサイトカインであり、免疫細胞をはじめとする種々の細胞に影響を及ぼす。生体防御の最前線にあたるNK細胞は以前からIFN- β により活性が増強することが知られているが、その分子メカニズムに関しては不明な点が多い。また、NK細胞は活性化レセプターと抑制性レセプターからのシグナルのバランスのよって標的細胞を認識し傷害することが知られている。NK活性化レセプターの1つNKG2Dは、NK細胞の主たる活性化レセプターであることが報告されている。我々は、インターフェロンによるNK細胞の活性化に分子機構を明らかにすることを目的に、1. インターフェロンによるシグナルの活性化、2. インターフェロンによるNK細胞認識機構の増強、特にNK活性化レセプターNKG2Dの発現増強について研究を行った。

方法

IFN- β のシグナルの下流で働くと考えられている Interferon Regulatory Factor (IRF) に着目し、IRF欠損マウスを用いて、NK細胞の細胞傷害活性を検討した。IRF-1遺伝子欠損マウスは、IL-15の産生の異常によりNK細胞の分化が障害されているため、IRF-1遺伝子欠損NK細胞を得るために、IRF-1遺伝子欠損骨髓細胞を野生型マウス(WT)に骨髓移植しキメラマウスを作成することを試みた。これらキメラマウスや遺伝子欠損マウスより脾臓細胞を分離し、インターフェロンあるいは陽性対照としてNK細胞を活性化するサイトカインであるIL-12を加え培養後、細胞障害活性を測定し評価した。

NK活性化レセプターNKG2DのリガンドはRAE-1が代表的であるが、NKG2DおよびRAE-1の発現制御機構については不明なため、まず、5'-RACE法により転写開始点を決定し、プロモーター解析を行った。さらに、インターフェロンの有無のより発現が増強されるか否かを検討した。

結果および考察

1. インターフェロンによるシグナルの活性化

IRF-1 遺伝子欠損マウス骨髄細胞は、WT マウスに移植しキメラマウスを作成すると NK 細胞が分化した。この NK 細胞は IRF-1 遺伝子欠損造血幹細胞由来であった。このキメラマウスから脾臓細胞を分離し、in vitro でインターフェロン刺激した後細胞障害活性を検討したところ、IRF-1 欠損 NK 細胞は細胞傷害活性が増強した。それに対し、IRF-9 遺伝子欠損 NK 細胞では、インターフェロン刺激においても細胞傷害活性は増強しなかった。このことから、インターフェロンにおける NK 細胞活性増強は IRF-9 を介したシグナルが重要であることが判明した。

2. インターフェロンによる NK 細胞認識機構の増強

NKG2D および RAE-1 の 5'-RACE による実験により、転写開始点を決定した。特に RAE-1 epsilon にはあらたな Exon が存在することが判明した。プロモーター解析を現在進めており、インターフェロンに応答しうる配列が存在する可能性を追究し結果を得つつある。

多発性硬化症における Nurr1 の関与

○三宅幸子¹⁾、土居芳充¹⁾、大木伸司²⁾、山村 隆²⁾

- 1) 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部
- 2) 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第六部

背景) これまで、多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)患者末梢血中の T 細胞において健常人と比較して上昇している分子群を DNA マイクロアレイを用いて同定し、報告してきた。今回は、その中で健常人との差における p 値が最も低い分子 Nurr1 に注目した。Nurr1 は、Steroid thyroid receptor superfamily に属するオーファンリセプターで、T 細胞受容体刺激や炎症性サイトカインなどによって発現が誘導される。今回我々は、T細胞における Nurr1 の機能解析を行った。

方法と結果) まず、DNA マイクロアレイの結果を検証するため、MS 末梢血 T 細胞と健常人末梢血 T 細胞における Nurr1 の発現を real-time PCR 法を用いて検討し、MS で有意に上昇していることを確認した。次に、C57/BL6 マウスに MOG₃₅₋₅₅ ペプチドを用いて実験的自己免疫性脳脊髄炎(Experimental Autoimmune Encephalomyelitis : EAE) を誘導し、脳脊髄(CNS)浸潤細胞、リンパ節細胞、脾臓細胞を採取し、それぞれから T 細胞を分離し real-time PCR を用いて Nurr1 の発現レベルを比較すると、CNS 浸潤 T 細胞において特異的に上昇していた。CNS 浸潤 T 細胞からのサイトカイン産生を調べると、IL-17 産生細胞が優位であった。IL-17 は EAE 発症に重要なサイトカインであることから、Nurr1 の IL-17 産生に与える影響について検討した。

T 細胞株を用いてリポーターアッセイを行うと、Nurr1 を過剰発現させると IL-17,IFN- γ ,IL-2 いずれのサイトカインの産生も増強した。マウス CD4 T 細胞に、Nurr1 の siRNA を導入してその機能を抑制すると、抗 CD3 抗体刺激により産生される IL-17,IFN- γ ,IL-2 いずれのサイトカインの産生も低下した。TNF α の産生は影響を受けなかった。

考察) MS 患者末梢血での上昇がみられた Nurr1 は、EAE においては CNS 浸潤 T 細胞に特異的に発現が誘導されていた。Nurr1 発現細胞が CNS に特異的に浸潤するのか、CNS 局所において Nurr1 の発現が誘導されるかについては、今後の検討が必要である。また、Nurr1 の EAE への病態に与える影響は、今後 siRNA などを用いて検討していく予定である。

演題：食事性脂質と NKT, T 細胞機能に関する研究

所属・氏名：菊地誠志（国立札幌南病院神経内科），○宮崎雄生，新野正明，佐々木秀直（北海道大学神経内科），宮岸隆司，深澤俊行（西円山病院神経内科），宮崎晶子（北海道大学眼科），岩渕和也，小野江和則（北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野）

【背景】多発性硬化症を初めとする自己免疫疾患の発症や病態には環境要因と遺伝的要因の双方が関与していると考えられている。我が国では第二次世界大戦後，生活習慣の急速な西洋化に伴って食習慣が大きく変化してきているが，中でも総エネルギー摂取量に対する脂質の割合上昇が顕著である。食事性脂質と多発性硬化症との関係は古くから疫学的検討や動物実験が行われているが，そのメカニズムの詳細は明らかにされていない。われわれは以前に，動脈硬化食（脂肪 15%，コレステロール 1.25%，コール酸 0.5%）摂取が natural killer T (NKT) 細胞からの Th1 系サイトカイン産生増強を介してマウス動脈硬化促進的に働くことを見いだしている。今回は高脂肪食が NKT 細胞，T 細胞免疫系に与える影響につき検討した。

【方法】5～8 週齢 C57BL/6 (WT B6) に通常食（脂肪 4.3%，コレステロール 0.03%）および高脂肪食（脂肪 21.2%，コレステロール 0.2%）を 3 週間摂取させ， α -galactosylceramide (α -GalCer) 投与による血中 interferon (IFN) γ ，Interleukin (IL) -4 産生を測定した。また肝臓，脾臓における NKT 細胞，樹上細胞の表面抗原をフローサイトメトリーで解析した。次に WT B6 および，CD1d^{-/-}マウスに通常食，高脂肪食を摂取させ，ovalbumin (OVA) 323-339 ペプチドに対する T 細胞反応を解析した。また高脂肪食が human interphotoreceptor retinoid binding protein (hIRBP) 1-20 ペプチドにより誘導した experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) へおよぼす影響を解析した。

【結果】高脂肪食摂取により， α -GalCer 投与による血中 IFN- γ 産生が低下した。血中 IL-4 産生には変化がなかった。高脂肪食摂取により肝臓の総単核細胞数および，NKT 細胞数が上昇しており，NKT 細胞上の NK 受容体発現変化や樹上細胞上の CD1d 発現低下などを伴っていた。組織学的に，肝臓は脂肪肝を呈し