

200730045A

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

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

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山 村 隆

平成20年（2008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・神経センター神経研究所 山村 隆 1

II. 分担研究報告

- 腸内環境と自己免疫病態の関連に関する研究
国立精神・神経センター神経研究所 山村 隆 6
- 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 10
- Invariant $V\alpha 19$ 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
(株)三菱化学生命科学研究所 島村 道夫 14
- 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
徳島大学疾患酵素学研究センター 松本 満 21
- 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 23
- MR1 拘束性 T 細胞の解析方法の確立に関する研究
国立精神・神経センター神経研究所 大木 伸司 25

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 28

IV. 研究成果の刊行物・別刷 29

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

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

MR1 分子に拘束された非ペプチド抗原を認識する MAIT 細胞は、消化管の粘膜固有相に集族し、腸内細菌依存性に発生するユニークな細胞集団である。MAIT 細胞には多発性硬化症の動物モデル EAE の発症を抑制する作用があり（Nature Immunol 7:987, 2006）、腸内細菌、消化管免疫、自己免疫との密接な関連が明らかになって来た。近年、我が国において多発性硬化症（MS）の顕著な増加傾向が見られるが、我々は、それが「生活習慣の欧米化」による「腸内細菌の偏倚」と免疫制御機構の変調に基づくものであるという仮説を提唱している。この仮説を検証するために、MAIT 細胞の免疫制御機能に関する基盤研究と、腸内細菌叢偏倚による免疫修飾のメカニズムの解明に関する研究を進めている。本年度は、抗生物質投与によって MS の動物モデル EAE が抑制されることを示し、その機序を明解析した。MS の新たな治療・予防戦略の策定に有用な成果と思われる。

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
島村 道夫 (株)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
松本 満 徳島大学疾患酵素学研究センター
免疫病態研究部門 教授
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
大木 伸司 国立精神・神経センター
神経研究所疾病研究第六部 室長

推測し、生活習慣（食生活）の改善によって MS の発症を予防できる可能性を考えている（MS の生活習慣病仮説）。

腸管リンパ球は全リンパ球の 60% を占めるが、その中には腸内細菌依存性の免疫制御細胞（MAIT 細胞）が存在する（Nature Immunology 7:987-994, 2006）。MAIT 細胞は、消化管粘膜固有相に集族し、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）。このリンパ球は、非ペプチド抗原を認識する消化管免疫の重要な制御細胞と言われていたが、我々は同細胞が MS の脳内に浸潤すること、動物モデル EAE の発症を抑制することなどを証明した。このように MAIT 細胞は腸内環境と自己免疫を結びつける重要なリンパ球で、MS の予防・治療戦略を策定する際に、その基盤研究はきわめて重要な意味を持ちうるものと考えられる。

A. 研究目的

MS の発症には遺伝因子と非遺伝因子が関与する。最近になって、非遺伝因子の重要性が強く認識されている。中でも腸内細菌叢および腸内環境の重要性が注目されているが、本研究グループは、「腸内環境の変化」と「日本人 MS 患者の近年の増加」に密接な関連のあることを

本年度は、MAIT細胞の基盤研究として、関節炎モデルに対するMAIT細胞の役割の解明（担当：三宅）、MAIT細胞のサイトカイン産生に関する研究（担当：島村）、MAIT細胞特異的モノクローナル抗体の樹立（担当：大木）を進める一方で、腸内細菌叢と自己免疫疾患の関係を解析するために、経口抗生物質投与がEAE発症に及ぼす影響を検討した（山村）。

B. 研究方法

B-1: 抗生物質投与によるEAE修飾実験

腸管非吸収性の抗生物質3種類（カナマイシン 1 mg/ml、コリスチン 2000 U/ml、バンコマイシン 0.1 mg/ml）を溶解した水を、7日間マウスに与えた。その後、糞便、腸間膜リンパ節（MLN）及び脾臓（SPL）を採取。糞便からはゲノムDNAを抽出し、ゲノムライブラリを作製。それをもとにアレイ（フローアレイ）を作製し、腸内細菌叢の変化を解析した。

MLNおよびSPLからリンパ球を分離し、固相化した抗CD3抗体で72時間刺激した後、培養上清中のサイトカイン量を測定した。抗生物質の投与開始後7日目に、MOG 35-55ペプチドの感作によってEAEを誘導し、臨床スコアと病理所見を、抗生物質投与対照群と比較した。

B-2: MR1欠損マウスにおける関節炎モデルの誘導実験

関節炎はCII抗原をCFAと混和し、二回免疫（day 0とday 21）することによって誘導した。抗体誘導関節炎はCIIモノクローナル抗体カクテルを静脈内投与し二日後にLPSを腹腔内投与、もしくはK/BxN血清を腹腔内投与して誘導した。

B-3: MAIT細胞のサイトカイン産生の研究

MAIT細胞を過剰発現するトランスジェニックマウス（V α 19 Tg）、および非トランスジェニックマウスの肝臓単核球を分離し、固相化CD3抗体で刺激し、細胞からmRNAを抽出してDNA

マイクロアレイ解析を行った。また、CD3抗体の濃度を変化させて、培養上清中のサイトカインを測定した。

その他の実験方法については、分担研究報告書に記載された通り。

（倫理面への配慮）

動物実験に関しては、当研究所の動物実験規定に従い、実験計画書の承認を受けて行った。

C. 研究結果

B-1: 抗生物質投与によるEAE修飾実験

抗生物質投与により、腸内細菌叢が著明に変化することをフローアレイによって確認した。抗生物質投与群ではMLN由来のT細胞増殖能は有意に低下し、IL-17、TNF- α 、IFN- γ 、IL-6などの炎症性サイトカインの産生も抑制されたが、抗炎症性サイトカインであるIL-10は有意に上昇した。一方、SPL由来のT細胞については、抗生物質投与の影響は見られなかった。

対照群の糞便からElsenらの方法により抽出した可溶性成分（fecal antigen）で刺激すると、MLN由来T細胞は大量のIL-17を産生した。しかし、抗生物質投与群から抽出したfecal antigenでは、IL-17の誘導能が顕著に低下していた。以上の結果から、抗生物質投与は、腸内細菌叢を偏倚させ、その結果、腸管関連リンパ組織に集積するIL-17産生細胞（主にTh17）が抑制されることが示唆された。また抗生物質投与群では、EAEの臨床症状および病理学的変化が有意に軽減された。しかし、 β 2-microglobulin欠損マウスでは、この結果は再現できず、抗生物質によるEAE抑制には、MHCクラスIまたはMHC class Ib依存性T細胞の存在が必須であることが示唆された。

B-2: MR1欠損マウスにおける関節炎モデルの

誘導実験

コラーゲン誘導関節炎の症状については、B6マウスに比較して、MR1 欠損マウスで有意に重篤であった。一方、CII カクテル抗体関節炎ならびに K/BxN 血清移入関節炎では、MR1 欠損マウスにおいて、むしろ関節炎が抑制される傾向が見られた。

B-3: MAIT 細胞のサイトカイン産生の研究

MAIT 細胞が豊富に含まれるリンパ球を CD3 抗体で刺激すると、IL-17A および IL-22 遺伝子の顕著な発現が観察された (DNA マイクロアレイ解析)。

CD3 抗体の濃度を下げると、培養開始 2 日目の培養上清における Th2 サイトカイン優位が観察された。

その他の研究の結果については、分担研究報告書に記載された通り。

D. 考察

本研究では、「MAIT 細胞に関する基盤研究」と「腸内環境と自己免疫疾患の関連」に係る解析を平行して行い、MS 患者数増加の背景に潜む生活習慣 (腸内環境) の乱れを明らかにすることを目指している。二年目の研究としては、後者 (腸内環境と自己免疫) の研究において大きな進展が見られたが、前者 (MAIT 細胞の基盤研究) についても、着実な前進が見られた。三宅は MAIT 細胞を欠損する MR1 ノックアウトマウスに、T 細胞/B 細胞依存性の関節炎 (コラーゲン誘導関節炎) と、T 細胞/B 細胞には依存せず自然免疫に依存する関節炎 (抗体誘導関節炎) を惹起して、その経過を観察した。その結果、前者については、関節炎の悪化が見られ、MR1 欠損マウスにおける EAE の増悪に対応するものと考えられた。しかし、T 細胞や B 細胞の

関与しない関節炎では、むしろ MR1 欠損マウスで症状が軽くなった。このきわめて興味深い観察は、同細胞が獲得免疫の介在する病態を制御する一方で、自然免疫の介在する病態を促進する可能性を示唆する。MAIT 細胞の性質の一端を示す新しい知見である。

不適切な抗生物質投与がアレルギー疾患や腸炎の発症に関連するという可能性については、以前から多くの研究者が指摘している。しかし、臨床的な観察にとどまり、機序については良くわかっていない。我々は、本年度の研究で、腸管非吸収性の抗生物質投与により腸内細菌を偏倚させると腸間膜リンパ節 T 細胞の IL-17 産生能が低下し、EAE の発症も抑制されることを示した。また糞便には抗生物質感受性の Th17 細胞誘導因子が存在することも証明した。興味深いことに、抗生物質の EAE 抑制効果は、 β 2-microglobulin 欠損マウスでは再現できなかった。同マウスでは、MHC クラス I 依存性 CD8+ T 細胞、および MHC クラス Ib 依存性 T 細胞 (NKT 細胞、MAIT 細胞を含む) を欠損しているため、これらの細胞が、腸内環境偏倚による自己免疫疾患修飾の鍵を握ることが推測される。現在、MR1 欠損マウス、CD1d 欠損マウス、J α 281 欠損マウス (それぞれ、MAIT 細胞、NKT 細胞、invariant NKT 細胞を欠損) を用いて、同様の実験を進行中である。

腸管粘膜に存在する樹状細胞 (DC) は、腸管腔に foot process を伸張させている。この突起を介して DC は腸内内容物 (ペプチド等) を取り込み、さらに所属リンパ節まで移動して T 細胞に提示する。このように、免疫系は腸内環境を常時モニターしていることが、最近の研究で明らかにされている。我々のデータも、糞便成分が、消化管免疫、さらには全身の免疫系を修飾することを意味し、腸内細菌叢と免疫系の密接な関連を確認するものである。MS 等の自己

免疫疾患の発症が、腸内細菌の状態を整えることによって抑制される可能性すら示唆し、最終年度には、その具体的方法まで明らかにしたいと考えている。

E. 結論

腸内環境が、MSの動物モデルEAEの発症に大きな影響を与えることがわかった。この実験的事実は、「我が国におけるMSの増加が生活習慣の欧米化によるものである」という我々の仮説を裏打ちし、今後の疾病予防や治療法開発に役立てるべき重要な情報だと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

[国際雑誌]

- 1) Kaieda, S., S. Oki, C. Tomi, T. Yamamura and S. Miyake: Activation of invariant natural killer T cells by synthetic glycolipid ligands suppresses autoantibody-induced arthritis. *Arthr. Rheumat.* 56:1836-1845, 2007
- 2) Sato, W., T. Aranami, and T. Yamamura: Cutting Edge. Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5-phenotype. *J. Immunol.* 178:7525-7529, 2007
- 3) Sakuishi, K., S. Oki, M. Araki, S.A. Porcelli, S. Miyake, and T. Yamamura: Invariant NKT cells biased for IL-5 production act as crucial regulators of inflammation. *J.Immunol.* 179 : 3452-3462, 2007
- 4) Ambrosino, E., M. Terabe, R.C. Halder, J. Peng, S. Takaku, S. Miyake, T. Yamamura, V. Kumar, and J.A. Berzofsky: Cross-regulation between type I and type II NKT cells in regulating tumor immunity: A new immunoregulatory axis. *J. Immunol.* 179:5126-5136, 2007

5) Shimamura, M., Y-Y. Huang, N. Okamoto, N. Suzuki, J. Yasuoka, K. Morita, A. Nishiyama, Y. Amano, T. Mishina: Modulation of Va19 NKT cell immune responses by a-mannosyl ceramide derivatives consisting of a series of modified sphingosine. *Eur. J. Immunol.* 37: 1836-1844, 2007

6) Shimamura, M., Y-Y. Huang, N. Okamoto, Y. Watanabe, R. Murakami, T. Kinoshita, Y. Hirabayashi, C. Murakata, Y. Ito, and T. Ogawa: Glycolipids with non-reducing end α -mannosyl residues that have potentials to activate invariant V α 19 NKT cells. *FEBS J.* 274: 2921-2932, 2007

7) Hamazaki, Y., H. Fujita, T. Kobayashi, Y. Choi, H.S. Scott, M. Matsumoto, and N. Minato: Medullary thymic epithelial cells expressing Aire represent a unique lineage derived from cells expressing claudin. *Nature Immunol.* 8: 304-311, 2007

2. 学会発表

[国際学会]

- 1) Terabe M, Ambrosino E, Takaku S, Peng J, Miyake S, Halder R, Yamamura T, Kumar V, Berzofsky JA: Type II NKT cells suppress tumor immunosurveillance enhanced by type I NKT cells. 94th Annual Meeting of The American Association of Immunologists, Inc. Miami Beach, Florida, USA, 5.19, 2007
- 2) Aranami T, Miyake S, and Yamamura T: CD11c on NK cells mirrors the temporal disease activity of multiple sclerosis. FOCiS 2007, San Diego, USA, 6.10, 2007
- 3) Doi Y, Oki S, Miyake S, and Yamamura T: Functional involvement of NR4A2 in the pathogenesis of multiple sclerosis. FOCiS 2007, San Diego, USA, 6.10, 2007
- 4) Oki S, Fujita M, Ootsuka T, Tomi C, Mizuno M, Kaieda S, Yamamura T, and Miyake S: Functional

analysis of carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. FOCiS 2007, San Diego, USA, 6.10, 2007

5) Lin, Y., S. Miyake, and T. Yamamura: Obstructing regulatory T cells as a strategy used by dangerous self-peptide. Mini-symposium-35. Regulatory T cells I. 13th International Congress of Immunology. 8.23, 2007

6) Yago, T., R. Tajima, S. Kaieda, S. Oki, T. Yamamura, and S. Miyake: MR1-Restricted V α 19⁺ T Cells Ameliorate Murine Models of Arthritis. 2007 ACR (American College of Rheumatology), Annual Scientific Meeting, Boston, 11.9, 2007

7) Terabe, M., E. Ambrosino, R. Halder, J. Peng, S. Takaku, S. Miyake, T. Yamamura, F. Kumar, and J.A. Berzovsky: A new immunoregulatory axis defined by type I and type II NKT cells to regulate tumor immunity. Keystone Symposium. Keystone, Colorado, 2.24, 2008

8) Shimamura, M., Y[^]Y. Huang, N. Okamoto, and T. Mishina: Glycolipids with non-reducing end α -mannosyl residues that have potentials to activate invariant V α 19 NKT cells. 14th. European Carbohydrate Symposium, Luebeck, Germany, Sept.4, 2007

[国内学会]

1) 土居芳充、大木伸司、三宅幸子、山村 隆：多発性硬化症における病原性 T 細胞のサイトカイン産生制御機構。第 19 回日本神経免疫学会学術集会，金沢，2007. 4.12

2) 横手裕明、Croxford J. Ludovic、水澤英洋、三宅幸子、山村 隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎における腸内フローラの役割に関する検討。第 19 回日本神経免疫学会学術集会，金沢，2007. 4.13

3) 横手裕明、Croxford Ludovic、三宅幸子、

水澤英洋、山村 隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎における腸内フローラの役割に関する検討。第 48 回日本神経学会総会学術集会，名古屋，2007. 5.17

4) 横手裕明、J. Ludovic Croxford、水澤英洋、大木伸司、三宅幸子、山村 隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎における腸内フローラの役割に関する検討。ワークショップ 2，第 35 回日本臨床免疫学会，大阪，2007. 10.19

5) Yago, T., S. Kaieda, S. Oki, T. Yamamura, and S. Miyake: MR1 拘束性 T 細胞によるマウス関節炎モデルの制御。第 35 回日本臨床免疫学会，大阪，2007. 11.21

6) Yokote, H., J.L. Croxford, H. Mizusawa, S. Oki, S. Miyake, and T. Yamamura: 実験的自己免疫性脳脊髄炎における腸内フローラの役割に関する検討。ワークショップ 40 臓器特異的自己免疫疾患 I: 自己免疫疾患の病因。第 37 回日本免疫学会総会，東京，2007. 12.22

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

腸内環境と自己免疫病態の関連に関する研究

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

多発性硬化症（MS）の増加傾向は、「生活習慣の欧米化」による「腸内細菌の偏倚」と「免疫制御機能の変調」に基づくものであるという仮説を提唱し、それを実験的に検証した。腸管非吸収性の抗生物質（カナマイシン、コリスチン、バンコマイシン）をマウスに 1 ないし 2 週間経口投与すると、1) 腸内細菌叢の有意な偏倚、2) 腸間膜リンパ球の IL-17 産生能の顕著な低下、3) 糞便抗原成分のリンパ球刺激による IL-17 誘導活性の低下、4) 実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）の軽症化が見られた。以上の結果から、腸内細菌偏倚による Th17 細胞の抑制が、EAE の抑制につながっている可能性が示唆された。さらに、同じ実験をβ2-microglobulin 欠損マウスで行ったところ、抗生物質投与の効果は見られなかった。抗生物質投与による自己免疫疾患の修飾において、MHC クラス I 依存性の CD8+ T 細胞、MHC クラス Ib 依存性 T 細胞（NKT 細胞、MAIT 細胞を含む）が、必須であることが推測された。今後、自己免疫疾患 MS の発症に抑制的あるいは促進的な腸内環境の実態を明らかにし、MS の新規発症の抑制につながる成果であると考えられる。

A. 研究目的

MS の発症には遺伝因子と非遺伝因子が関与する。最近になって、非遺伝因子の重要性が強く認識されている。中でも腸内細菌叢および腸内環境の重要性が注目されているが、本研究グループは、「腸内環境の変化」と「日本人 MS 患者の近年の増加」に密接な関連のあることを推測し、生活習慣（食生活）の改善によって MS の発症を予防できる可能性を考えている（MS の生活習慣病仮説）。腸管リンパ球は全リンパ球の 60% を占めるが、その中には腸内細菌依存性の免疫制御細胞（MAIT 細胞）が存在することを、これまでに明らかにしてきた（Nature Immunology 7:987-994, 2006）。本研究では腸内細菌叢を偏倚させることによ

て、自己免疫疾患の発症が抑制（または促進）されることを証明するために、経口抗生物質投与がマウスの免疫系および自己免疫疾患発症に及ぼす影響を明らかにすることを目指した。

B. 研究方法

マウスは、C57BL/6J (B6) マウスおよび B6 バックグラウンドのβ2-microglobulin ノックアウトマウスを用いた。抗生物質投与実験では、腸管非吸収性の抗生物質 3 種類（カナマイシン 1 mg/ml、コリスチン 2000 U/ml、バンコマイシン 0.1 mg/ml）を溶解した水を、7 日間マウスに与えた。その後、糞便、腸間膜リンパ節（MLN）及び脾臓（SPL）を採取。糞便からはゲノム DNA を

抽出し、ゲノムライブラリを作製。それをもとにアレイ（フローラアレイ）を作製し、腸内細菌叢の変化を解析した。

MLN および SPL からリンパ球を分離し、固相化した抗 CD3 抗体で 72 時間刺激した後、培養上清中のサイトカイン量を cytometric bead array 及び ELISA 法を用いて測定した。また細胞増殖反応は³H-チミジンの取り込みによって評価した。

抗生物質の投与開始後 7 日目に、MOG 35-55 ペプチドの感作によって EAE を誘導し、臨床スコアと病理所見を、抗生物質比投与対照群と比較した。

（倫理面への配慮）

動物実験に関しては、当研究所の動物実験規定に従い、実験計画書の承認を受けて行った。

C. 研究結果

フローラアレイの検討により、1 週間の抗生物質投与により、腸内細菌叢が著明に変化することが明らかになった。また、抗生物質投与群では MLN 由来の T 細胞増殖能は有意に低下し、IL-17、TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生も抑制されていたが、抗炎症性サイトカインである IL-10 は有意に上昇していた。一方、SPL 由来の T 細胞については、抗生物質投与の影響は見られなかった。

対照群の糞便から Elsen らの方法により抽出した可溶性成分（fecal antigen）で刺激すると、MLN 由来 T 細胞は大量の IL-17 を産生した。しかし、抗生物質投与群から抽出した fecal antigen では、IL-17 の誘導能が顕著に低下していた。以上の結果から、抗生物質投与は、腸内細菌叢を偏倚させ、その結果、腸管関連リンパ球の IL-17 産生が抑制されることが示唆された。

MOG35-55 ペプチドによって EAE を誘導したところ、

抗生物質投与群では、EAE の臨床症状および病理学的変化が有意に軽減されることがわかった（EAE の max score: 3.2 \pm 0.2 versus 1.8 \pm 0.2）。

しかし、同じ実験を

β 2-microglobulin 欠損マウスで行ったところ、抗生物質の影響は見られず、抗生物質による EAE 抑制には、MHC クラス I または MHC class Ib 依存性 T 細胞の存在が必須であることが示唆された。

D. 考察

本研究では、抗生物質投与によって腸内細菌を偏倚させると腸間膜リンパ節 T 細胞の IL-17 産生能が低下し、それに合わせて EAE の発症も抑制されることを示した。また抗生物質投与によって、腸内抗原の Th17 細胞刺激能が低下し、糞便には抗生物質感受性の Th17 細胞誘導因子が存在することが推測される。興味深いことに、抗生物質の EAE 抑制効果は、 β 2-microglobulin 欠損マウスでは再現できなかった。同マウスでは、MHC クラス I 依存性 CD8⁺ T 細胞、および MHC クラス Ib 依存性 T 細胞（NKT 細胞、MAIT 細胞を含む）を欠損している。したがって、これらの細胞が、腸内環境偏倚による自己免疫疾患修飾の鍵を握ることが推測される。現在、MR1 欠損マウス、CD1d 欠損マウス、Ja281 欠損マウス（それぞれ、MAIT 細胞、NKT 細胞、invariant NKT 細胞を欠損）を用いて、同様の実験を進行中であるが、近日中に、抗生物質投与の EAE 抑制効果に決定的な役割を果たす細胞集団が同定できると思われる。

腸管粘膜に存在する樹状細胞（DC）は、腸管腔に foot process を伸張させている。この突起を介して DC は腸内内容物（ペプチド等）を取り込み、さらに所属リンパ節まで移動して T 細胞に提示する。このように、免疫系は腸内環境に関する情報を、常時モニターしていることが、最近の実験で明らかにされている。我々のデータも、糞便成分が、消化管免疫、さらには全身の免疫系を修

飾することを意味している。

まだ研究は始まったところであるが、今回得られた実験結果は、腸内細菌叢と免疫系の密接な関連を確認するものであり、またMS等の自己免疫疾患の発症が、腸内細菌の状態を整えることによって抑制される可能性すら示唆している。

E. 結論

抗生物質による腸内環境の修飾は、MSの動物モデルの発症に実質的な影響を与える。今後の疾病予防や治療法開発に役立つべき情報だと考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

[国際雑誌]

1)Kaieda, S., S. Oki, C. Tomi, T. Yamamura and S. Miyake: Activation of invariant natural killer T cells by synthetic glycolipid ligands suppresses autoantibody-induced arthritis. *Arthr. Rheumat.* 56:1836-1845, 2007

2)Sato, W., T. Aranami, and T. Yamamura: Cutting Edge. Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5-phenotype. *J. Immunol.* 178:7525-7529, 2007

3)Sato, J., Z. Illes, A. Peterfalvi, H. Tabunoki, C. Rozsa, and T. Yamamura: Aberrant transcriptional regulatory network in T cells of multiple sclerosis. *Neurosci. Lett.* 422: 30-33, 2007

4)Sakuishi, K., S. Oki, M. Araki, S.A. Porcelli, S. Miyake, and T. Yamamura: Invariant NKT cells biased for IL-5 production act as crucial regulators of inflammation. *J.Immunol.* 179 : 3452-3462, 2007

5)Ambrosino, E., M. Terabe, R.C. Halder, J. Peng, S.

Takaku, S. Miyake, T. Yamamura, V. Kumar, and J.A. Berzofsky: Cross-regulation between type I and type II NKT cells in regulating tumor immunity: A new immunoregulatory axis. *J. Immunol.* 179:5126-5136, 2007

6)Croxford, J.L., G. Pryce, S.M. Jackson, C. Ledent, G. Giovannoni, R.G. Pertwee, T. Yamamura, and D. Baker: Cannabinoid-mediated neuroprotection, not immunosuppression, may be more relevant to multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 193: 120-129, 2008

2. 学会発表

[国際学会]

1)Terabe M, Ambrosino E, Takaku S, Peng J, Miyake S, Halder R, Yamamura T, Kumar V, Berzofsky JA: Type II NKT cells suppress tumor immunosurveillance enhanced by type I NKT cells. 94th Annual Meeting of The American Association of Immunologists, Inc. Miami Beach, Florida, USA, 5.19, 2007

2)Aranami T, Miyake S, and Yamamura T: CD11c on NK cells mirrors the temporal disease activity of multiple sclerosis. FOCiS 2007, San Diego, USA, 6.10, 2007

3)Doi Y, Oki S, Miyake S, and Yamamura T: Functional involvement of NR4A2 in the pathogenesis of multiple sclerosis. FOCiS 2007, San Diego, USA, 6.10, 2007

4)Oki S, Fujita M, Ootsuka T, Tomi C, Mizuno M, Kaieda S, Yamamura T, and Miyake S: Functional analysis of carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. FOCiS 2007, San Diego, USA, 6.10, 2007

5)Lin, Y., S. Miyake, and T. Yamamura: Obstructing regulatory T cells as a strategy used by dangerous self-peptide. Mini-symposium-35. Regulatory T cells I. 13th International Congress of

Immunology. 8.23, 2007

6)Yago, T., R. Tajima, S. Kaieda, S. Oki, T. Yamamura, and S. Miyake: MR1-Restricted V α 19i T Cells Ameliorate Murine Models of Arthritis. 2007 ACR (American College of Rheumatology), Annual Scientific Meeting, Boston, 11.9, 2007

7)Terabe, M., E. Ambrosino, R. Halder, J. Peng, S. Takaku, S. Miyake, T. Yamamura, F. Kumar, and J.A. Berzovsky: A new immunoregulatory axis defined by type I and type II NKT cells to regulate tumor immunity. Keystone Symposium. Keystone, Colorado, 2.24, 2008

[国内学会]

1)土居芳充、大木伸司、三宅幸子、山村 隆：多発性硬化症における病原性 T 細胞のサイトカイン産生制御機構。第 19 回日本神経免疫学会学術集会，金沢，2007. 4. 12。

2)横手裕明、Croxford J. Ludovic、水澤英洋、三宅幸子、山村 隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎における腸内フローラの役割に関する検討。第 19 回日本神経免疫学会学術集会，金沢，2007. 4. 13

3)横手裕明、Croxford Ludovic、三宅幸子、水澤英洋、山村 隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎における腸内フローラの役割に関する検討。第 48 回日本神経学会総会学術集会，名古屋，2007. 5. 17

4)横手裕明、J. Ludovic Croxford、水澤英洋、大木伸司、三宅幸子、山村 隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎における腸内フローラの役割に関する検討。ワークショップ 2，第 35 回日本臨床免疫学会，大阪，2007. 10. 19

5)Yago, T., S. Kaieda, S. Oki, T. Yamamura, and S. Miyake:MR1 拘束性 T 細胞によるマウス関節炎モデルの制御。第 35 回日本臨床免疫学会，大阪，2007. 11. 21

6)Yokote, H., J.L. Croxford, H. Mizusawa, S. Oki, S. Miyake, and T. Yamamura: 実験的自己

免疫性脳脊髄炎における腸内フローラの役割に関する検討。ワークショップ 40 臓器特異的自己免疫疾患 I: 自己免疫疾患の病因。第 37 回日本免疫学会総会，東京，2007. 12. 22

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

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、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。本年度は、MR1 拘束性細胞が他の自己免疫病態において制御性細胞として機能するかどうかを検討するためにコラーゲン関節炎に与える影響を調べた。

A. 研究目的

MR1 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。本年度は、MR1 拘束性細胞が他の自己免疫病態において制御性細胞として機能するかどうかを検討する目的で、関節炎に与える影響を調べた。

B. 研究方法

コラーゲン関節炎 (Collagen-induced arthritis: CIA) は C57BL/6 マウス(B6)および MR1⁺マウス (MR1⁺)に CII を FCA と共に Day 0、21 に免疫し誘導し、抗体誘導関節炎は B6 マウスもしくは MR1^{-/-}マウスに抗 CII モノクローナル抗体カクテ

ルを 2mg/mouse で静脈投与し二日後に LPS を腹腔内投与、もしくは K/BxN 血清 150 μ l/匹を腹腔内投与して誘導した。関節炎は、臨床症状と病理所見にて評価を行った。CII に対するリコール反応、ならびに血清中の CIA 誘導後抗 CII 抗体を ELISA 法にて測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、当研究所の動物実験規定に従い、実験計画書の承認を受けて行った。

C. 研究結果

CIA 発症率、最大スコアともに、B6 に比較して MR1⁺マウスで有意に高値であった。病理所見でも、MR1⁺マウスでは、関節炎がより顕著であった。CII に対するリコール反応における IFN- γ 産生、血清中抗 CII 抗体価は B6 に比較して MR1⁺で高値であった。一方、CII カクテル抗体関節炎ならびに K/BxN 血清移入関節炎では MR1^{-/-}マウスにおいてコントロール B6 マウスと比較して関節炎が抑制された。

D. 考察

MR1 拘束性 V α 19i T 細胞は CIA に対し抑制的に働くが、抗体誘導関節炎の炎症増悪に関与する可能性が示唆された。CIA は、T 細胞、B 細胞の関与が必須であり、CIA において MR1 拘束性 T 細胞が病態抑制に働くことは、EAE における作用と類似していた。一方抗体誘導関節炎はリンパ球非依存性に惹起され、自然免疫細胞の関与が強いことが知られている。自然免疫細胞が中心となる炎症反応においては、むしろ病態悪化に関与することは興味深い、今後その作用機序の解析が重要であると考えられた。

また、今後の方向性としては、MR1 拘束性細胞による自己免疫病態抑制機構を検討する。MR1 拘束性 T 細胞は、腸管の粘膜固有叢に多く存在することから、腸内細菌叢がどのような影響を与えるかについて検討する。昨年、カナマイシン・コリスチン・バンコマイシン(KCV)投与による腸内細菌叢の改変によって、EAE が軽症化することを明らかにしたので、MR1^{-/-}マウスに KCV 投与を行って、EAE が抑制されるかどうかについて検討する。次に MR1 拘束性 T 細胞の活性化機序について、Toll 様受容体(TLR)がどのように関与するかについて検討する。V α 19iTCR トランスジェニック/CD1⁺マウスより NKT 細胞を分離し、各種 TLR の発現を調べるとともに各種 TLR リガンドに対する反応を検討する。また、V α 19iTCR トランスジェニック/CD1⁺マウスを MYD88^{-/-}マウスと交配し、V α 19iTCR トランスジェニック/CD1⁺ MYD88^{-/-}マウスを作製し、NKT 細胞の分化を調べるとともに、EAE や関節炎などの自己免疫疾患病態に与える影響を検討する。

E. 結論

MR1 拘束性細胞は関節炎モデルにおいて制御性細胞として機能することが明らかとなった。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

I 論文発表

原著

- 1) Toba T, Murata K, Nakanishi K, Takahashi B, Takemoto N, Akabane M, Nakatsuka T, Imajo S, Yamamura T, Miyake S and Annoura H. Minimum structure requirement of immunomodulatory glycolipids for predominant Th2 cytokine induction and the discovery of non-linear phytosphingosine analogs. **Bioorganic Med.Chem.Let.** 17:2781-4, 2007
- 2) Kaieda S, Tomi C, Oki S, Yamamura T and Miyake S. Activation of iNKT cells by synthetic glycolipid ligands suppresses autoantibody-induced arthritis. **Arthritis Rheum.** 56(6):18365-45, 2007
- 3) Sakuishi K, Oki S, Araki M, Porcelli SA, Miyake S, Yamamura T. Invariant NKT cells biased for IL-5 production act as crucial regulators of inflammation. **J.Immunol.** 179(6):3452-62, 2007
- 4) Ambrosino E, Terabe M, Halder RC, Peng J, Takaku S, Miyake S, Yamamura T, Kumar V, Berzofsky. Cross-regulation between Type I and Type II NKT cells in regulating tumor immunity: A new immunoregulatory axis. **J.Immunol.** 179(8):5126-36, 2007

総説

- 1) Oki S, Miake S. Invariant Natural Killer (iNKT) cells in asthma: A novel insight into the pathogenesis of asthma and the therapeutic implication of glycolipid ligands for allergic diseases. **Allergol Int.** 56(1):7-14, 2007
- 2) Miyake S and Yamamura T. Glycolipid autoimmunity **Int. Rev. Immunol.** 26(1&2):73-94, 2007
- 3) Miyake S and Yamamura T. NKT cells and autoimmune diseases: unrabeling the complexity. **Cur. Top. Microbiol. Immunol.** 314:251-67, 2007
- 4) Yamamura T, Sakuishi K, Illes Z and Miyake S. Understanding the behavior of invariant NKT cells in autoimmune diseases. **J. Neuroimmunol.** 1914(1-2):8-15, 2007
- 5) 大木伸司、三宅幸子 : 改変糖脂質抗原による iNKT 細胞を介した免疫制御 **生化学** 79(4): 357-62, 2007
- 6) 山村隆、三宅幸子 : NKT 細胞の糖質認識と免疫制御 **実験医学増刊** 25(7): 72-77, 2007

II 学会発表

国際学会

- 1) Miyake S, Oki S, Yamamura T. Activation of macrophages by glycolipid ligands for iNKT cells. Keystone symposia, The Macrophage, Colorado, April 11, 2007
- 2) Miyake S, Kaieda S, Oki S, Yamamura T. IFN- γ inhibits inflammatory arthritis via suppression of mast cell activation. The American Association of Immunologists 94th Annual Meeting, Maimai, Florida, May 18, 2007
- 3) Yago T, Tajima R, sdKaieda S, Oki S, Yamamura T, Miyake S. MRI-restricted V α 19i T cells ameliorate murine models of arthritis. American College of Rheumatology 71th Annual Scientific Meeting, Boston, MA, November 6, 2007 (Arthritis Rheum. 56(9):S387, 2007)

国内学会

- 1) 三宅幸子 : インバリアント NKT 細胞による自己免疫の制御、第 51 回日本リウマチ学会、横浜、4 月 26 日、2007
- 2) 林幼偉、三宅幸子、山村隆 : EAE 寛解期に誘導される CD69⁺CD103⁺の制御性 T 細胞は EAE 寛解維持・再誘導抑制を担う、第 19 回日本神経免疫学会学術集会、金沢、4 月 12 日、2007
- 3) 土居芳充、大木伸司、三宅幸子、山村隆 : 多発性硬化症における病原性 T 細胞のサイトカイン産生制御機構、第 19 回日本神経免疫学会学術集会、金沢、4 月 12 日、2007
- 4) 荒浪利昌、三宅幸子、山村隆 : MS 寛解期ナチュラルキラー細胞 CD11c は疾患活動性を反映する、第 19 回日本神経免疫学会学術集会、金沢、4 月 12 日、2007
- 5) 横手裕明、Croxford J. L., 水澤英洋、三宅幸子、山村隆 : 実験的自己免疫性脳脊髄炎における腸内フローラの役割に関する検討、第 19 回日本神経免疫学会学術集会、金沢、4 月 12 日、2007
- 6) 海江田信二郎、田島良亮、大木伸司、坂口志文、三宅幸子 : SKG マウスにおける結核死菌投与による関節炎の誘導 第 51 回日本リウマチ

学会、横浜、4月26日、2007

- 7) 田島良亮、海江田信二郎、大木伸司、三宅幸子：抗体誘導性関節炎におけるNKT細胞の機能解析 第51回日本リウマチ学会、横浜、4月26日、2007
- 8) 林幼偉、三宅幸子、山村隆：CD69陽性CD103陽性のCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性T細胞はEAEの寛解維持と再誘導抑制を担う、第48回日本神経学会総会、名古屋、5月16日、2007
- 9) 横手裕明、Croxford J.L., 水澤英洋、三宅幸子、山村隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎における腸内フローラの役割に関する検討、第48回日本神経学会総会、名古屋、5月16日、2007
- 10) 土居芳充、大木伸司、三宅幸子、山村隆：多発性硬化症における病原性T細胞のサイトカイン産生制御機構：第35回日本臨床免疫学会、大阪、10月19日、2007
- 11) 横手裕明、Croxford J.L., 水澤英洋、大木伸司、三宅幸子、山村隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎における腸内フローラの役割に関する検討：第35回日本臨床免疫学会、大阪、10月19日、2007
- 12) 大木伸司、市川大樹、山村隆、三宅幸子：プロテオミクスを用いたアナジ-T細胞内タンパク質の解析：第37回日本免疫学会、東京、11月20日、2007
- 13) 八子徹、海江田信二郎、大木伸司、山村隆、三宅幸子：MR1拘束性T細胞によるマウス関節炎モデルの抑制：第37回日本免疫学会、東京、11月20日、2007

14) 横手裕明、Croxford J.L., 水澤英洋、大木伸司、三宅幸子、山村隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎における腸内フローラの役割に関する検討：第37回日本免疫学会、東京、11月20日、2007

15) 林幼偉、三宅幸子、山村隆：危険な自己ペプチドが用いる手段としての制御性T細胞の阻害：第37回日本免疫学会、東京、11月20日、2007

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 α 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 発現 NKT 細胞 (V α 19 NKT 細胞) により多発性硬化症モデルの EAE の進行が抑制され、このことから V α 19 NKT 細胞の免疫系制御機能が期待される。この細胞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、V α 19NKT 細胞の抗原刺激に応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引き続き検討した。Invariant V α 19-J α 33 TCR α 鎖遺伝子導入 (V α 19 Tg) マウスから調製した V α 19NKT 細胞は培養中抗 CD3 抗体による刺激に応答して高い IL-17 遺伝子の発現を起こすことが DNA マイクロアレイ分析から明らかになり、これは従来の上清の IL-17 分析の結果と一致した。しかし、刺激に用いた抗 CD3 抗体の濃度を段階的に低くして刺激の強さを調節したところ、ある一定の濃度範囲では IL-4, IL-10 等の Th2 サイトカインの産生が IL-17 や IFN- γ に優先することがわかった。このことから V α 19NKT 細胞の炎症抑制機能が発揮される抗原刺激が生体内では存在することが示唆された。V α 19NKT 細胞の活性化剤として α -ManCer のセラミド部位にフェニル基を導入した化合物を見いだしたが、さらに種々の糖脂質の刺激能を検討した。その結果、コレステロールの α -Man 配糖体に同様の刺激能の存在が示唆されたが α -ManCer 誘導体の刺激能には及ばなかった。しかし同時に検討したコレステロールの α -Glc 配糖体の活性は見いだされず、抗原として非還元末端 α -Man 基の必要性が示唆された。これら活性化剤のなかから今回見いだされた V α 19 NKT 細胞の Th2 優勢の免疫応答を優先して誘導する化合物の検索が今後の目標となる。

A. 研究目的

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 (Croxford ら)。V α 19 NKT 細胞は TCR への刺激に応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。このサイトカイン産生能が実際どのような機構で免疫系ホメオスタシスをもたらす EAE 抑制に寄与するかを明らかにすることを目的として、この細胞の活性化に伴うサイトカインの分泌

機能について検討を加えた。

B. 研究方法

(1) $V\alpha 19$ NKT 細胞の抗原刺激に応答した遺伝子発現の網羅的分析

$V\alpha 19$ Tg マウス (TCR $C\alpha$ 遺伝子欠損バックグラウンド), あるいは $\beta 2$ -microglobulin 遺伝子欠損 ($\beta 2m^{-/-}$) 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, Cedarlane 社製、10 μ g/ml) による刺激下で培養し、2 日後細胞から mRNA を抽出し、cDNA を調製した。Affimetrix 社 gene chip を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。

(2) $V\alpha 19$ NKT 細胞の培養中でのサイトカイン分泌

$V\alpha 19$ Tg マウスおよび non-Tg (B6) マウスから調製した肝臓単核球を種々の濃度の固相化抗 CD3 抗体 (2C11) 上で培養し、1、2 日培養後の上清中のサイトカインを ELISA 法で定量した。

(3) $V\alpha 19$ NKT 細胞の糖脂質刺激によるサイトカイン分泌誘導

$V\alpha 19$ Tg マウス、non-Tg (B6) マウスあるいは $\beta 2m^{-/-}$ マウスから調製した肝臓単核球を種々の糖脂質の存在下培養後の上清中のサイトカインを ELISA 法で定量した。糖脂質は Birmingham University の P. Illarionov 博士、東海大学の小島直也教授から供与を受けた。

(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) $V\alpha 19$ NKT 細胞の抗原刺激に応答した遺伝子発現

$V\alpha 19$ -J $\alpha 33$ TCR 発現細胞が抗原刺激を受けたときに特異的に発現するサイトカインやケモカイン等の細胞因子、それらのレセプター遺伝子を網羅的に調べることはその機能を知る上での基礎となる。 $V\alpha 19$ NKT 細胞が過剰発生する Tg マウスの肝臓から単核球細胞を調製し、これを抗 CD3 抗体でコートしたウェル上で培養したときの前後での遺伝子発現を DNA マイクロアレイ法により網羅的に分析した。対照として $\beta 2m^{-/-}$ マウス肝臓単核球細胞を用いた (図 1)。

$V\alpha 19$ Tg 細胞の活性化に伴い IL-17A, IL-22 遺伝子発現の顕著な上昇が観察された。昨年度までに明らかにした培養上清のサイトカインの測定結果が転写レベルの分析から裏打ちされた。これは $V\alpha 19$ NKT 細胞の活性化に伴う Th17 細胞の分化誘導を暗示している。一方で IL-5, IL-13 の遺伝子高発現も観察された。これは蛋白レベルでの分析で明らかになっている IL-4, IL-10 の高発現と合わせ、invariant $V\alpha 19$ -J $\alpha 33$ TCR 発現細胞の存在により多発性硬化症の動物モデル (EAE) やコラーゲン誘導関節炎動物モデルにおける病状進行が抑制されること

を説明する。またアクソンガイダンスやミエリン再生への関与が示唆される semaphorin family のひとつ semaphorin 4F 遺伝子の相対的な高発現も示唆された。4D や 7F 同様に活性化 T 細胞での高発現が暗示される。

(2) $V\alpha 19$ NKT 細胞の TCR への刺激の強さに応答したサイトカイン分泌能の変化

$V\alpha 19$ NKT 細胞の抗原刺激に応答して、多発性硬化症等の炎症性自己免疫病の進行を推進する IL-17 が高発現することが遺伝子レベルでの分析によって示唆された。そこで TCR への刺激条件に依存して免疫応答が変化することを予測して、TCR 刺激に用いる抗 CD3 抗体の濃度を従来の実験で行った条件 ($10 \mu\text{g/ml}$) から段階的に低くして刺激の強さを調節した。 $V\alpha 19$ NKT 細胞の免疫応答を分析した結果、ある一定の濃度範囲 (今回使用した抗体では $0.01\sim 0.1 \mu\text{g/ml}$) では IL-4、IL-10 等の Th2 サイトカインの産生が培養 1 日目から 2 日目まで持続し、結果として 2 日目では IL-17 や IFN- γ 産生に優先することがわかった。このとき対照として行った $\beta 2m^{-/-}$ 細胞の培養ではこのような Th2 優勢のサイトカインの分泌は見られなかった。一方従来の TCR 刺激条件 ($2\text{C}11$ $10 \mu\text{g/ml}$) では培養 1 日目で優勢な IL-4 産生は培養 2 日目では IFN- γ 、IL-17 産生に置き換わった。これらのことから $V\alpha 19$ NKT 細胞の炎症抑制機能が発揮される抗原刺激が生体内では存在し、これにより $V\alpha 19$ NKT 細胞の Th2 免疫応答が優

先される可能性が示唆された。

(3) $V\alpha 19$ NKT 細胞の糖脂質刺激による免疫応答

これまでに $V\alpha 19$ NKT 細胞の活性化剤として α -ManCer のセラミド部位にフェニル基を導入した化合物を見いだしたが、ひきつづいて種々の糖脂質の刺激能を検討した。その結果、コレステロールの α -Man 配糖体に同様の刺激能の存在が示唆された。この化合物により誘導される $V\alpha 19$ NKT 細胞の免疫応答は α -ManCer 誘導体によるものには及ばなかったが、同時に検討したコレステロールの α -Glc 配糖体の活性は見出されなかった。このことから抗原活性における非還元末端 α -Man 基の必要性が示唆された。

D. 考察

$V\alpha 19$ NKT 細胞の抗原刺激に応答して IL-17 の高発現が遺伝子レベルでの発現からも支持された。 $V\alpha 19$ NKT 細胞の炎症性自己免疫病抑制効果を考える上で IL-17 など炎症昂進性サイトカインの発現誘導を説明付ける必要がある。

最近山村らはヒト $V\alpha 24$ invariant TCR 発現細胞株において invariant TCR への刺激の強さや様式に依存して産生するサイトカインが異なることを見出した。これを適用して $V\alpha 19$ NKT 細胞の invariant TCR に対する刺激の強さを抗 CD3 抗体の濃度を段階的に変化させることにより調節して免疫応答を調べたところ、この細胞でも同様に一定の濃度範囲では IL-4 等の Th2 サ