

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。また従来の刺激条件でも初期の段階では Th2 サイトカインの産生が優勢であった。このことから抗原提示細胞上での MR1 の発現や提示される抗原が制御することにより V α 19NKT 細胞の炎症抑制機能を発揮させる抗原刺激が生体内では存在することが強く示唆された。今後これを実証していく必要がある。

この適度な刺激の範囲で Th2 サイトカインの優勢に加え IL-6, TGF- β の産生が観察された。最近 IL-17 産生 Th17 細胞は IL-23 の作用を受けて炎症昂進性を示すが、TGF- β 、IL-6, あるいは IL-27 の作用を受けると type I regulatory T 細胞様に機能分化し、IL-10 を産生して (IL-17, IL-22 は産生しつつ) 炎症抑制に機能することが報告された。V α 19NKT 細胞は IL-27 産生細胞と共同することで type I regulatory T 細胞の分化誘導に寄与する可能性も示唆される。

V α 19 NKT 細胞の特異的活性化剤として新たにコレステロールの α -Man 配糖体が見いだされ、末端 α -Man 基の必要性が示唆された。引き続きこの化合物をもとに構造変換した物質の活性を検討しており、これまで見いだされた活性化剤のなかから本年度見いだされた 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。

E. 結論

Invariant V α 19-J α 33TCR 発現 NKT 細胞のサイトカイン分泌には TCR への抗原刺激

に依存して多様性がある。生体内でこの細胞による Th2 優先の免疫応答誘導の存在が今回示唆され、免疫系ホメオスタシスや EAE 抑制への寄与が可能なことが裏付けられた。このように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が示唆された V α 19 TCR 発現細胞の実効性のある活性化物質を見いだすことが有効な治療法開発につながる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Modulation of V α 19 NKT cell immune responses by α -mannosyl ceramide derivatives consisting of a series of modified sphingosine.

Michio Shimamura, Yi-Ying Huang, Naoki Okamoto, Nahoko Suzuki, Jouji Yasuoka, Kenji Morita, Akira Nishiyama, Yuusuke Amano, and Tadashi Mishina
Eur. J. Immunol. **37**: 1836-1844 (2007)

2. Glycolipids with non-reducing end α -mannosyl residues that have potentials to activate invariant V α 19 NKT cells.

Michio Shimamura, Yi-Ying Huang, Naoki Okamoto, Yutaka Watanabe, Ryoko Murakami, Taroh Kinoshita, Yoshio Hirabayashi, Chikara Murakata, Yukishige Ito, and Tomoya Ogawa,
FEBS. J. **274**:2921-2932 (2007)

3. Glycolipid stimulators for NKT cells bearing invariant V α 19-J α 33 TCR α chain.

Michio Shimamura,

Mini-Reviews in Medicinal Chemistry

(*in press*)

4. Activation of invariant V α 19-J α 33 TCR α -bearing cells by stimulation with certain α -mannosylated glycolipids.

Michio Shimamura

In "Glycolipids: New Research" Nova Science Publishers, New York, (*in press*)

2. 学会発表

1. 新規 V α 19NKT 細胞による α -マンノシル化糖脂質の特異的認識

島村道夫、黄怡瑩、岡本直樹、三品 正

第27回日本糖質学会（福岡）8月2日、2007年

2. Glycolipids with non-reducing end α -

mannosyl residues that have potential to activate invariant V α 19 NKT cells.

Michio Shimamura, Yi-Ying Huang, Naoki Okamoto, and Tadashi Mishina

14th European Carbohydrate Symposium, Luebeck, Germany, September 4, 2007

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 $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ invariant TCR 発現細胞の TCR への刺激に応答した遺伝子発現。

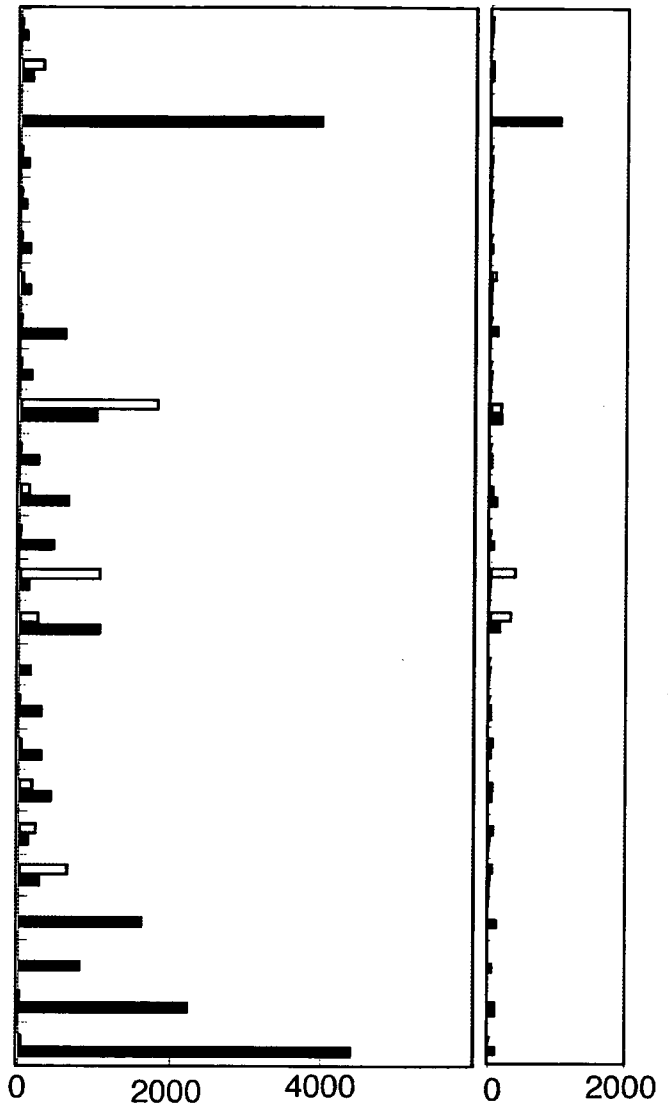
$V\alpha 19$ Tg TCR α -/-マウス肝臓単核球細胞、対照として $\beta 2m$ -/-マウス細胞を固相化抗 CD3 抗体で刺激前後の細胞につき、DNA マイクロアレイにより遺伝子発現を分析した。補正後の蛍光強度を示す。活性化前の細胞を白抜きで、活性化後の細胞を黒のカラムで表し、 $V\alpha 19$ Tg、 $\beta 2m$ -/-細胞それぞれについて結果を示した。使用した39000種のプローブで検出した転写物のうち $V\alpha 19$ Tg/ $\beta 2m$ -/-細胞の比率の上位のものにしぼって表示した。

遺伝子名 Vα19Tg/β2m-/- 比

Lgals3 4.2
 Rora 4.2
 IL-13 4.3
 Aldh112 4.5
 Trmp6 4.7
 Upp1 5.3
 Arg1 5.4
 Avpi1 5.5
 Ltb4r1 5.5
 CXCR6 5.9
 Lum 5.9
 Ndr1 6.0
 Sema4f 6.3
 CXCL2 6.3
 Smox 6.9
 Fzd7 6.9
 9430020k01Rik 7.0
 Selenium bp1 8.0
 CD8a 8.0
 Zbtb16 8.3
 CCR2 11.0
 IL-5 13.3
 Gm1960 14.2
 IL-22 22.0
 IL-17A 43.8

Vα19Tg

β2m-/-



■ TCRへの刺激後 □ TCRへの刺激前

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 徳島大学疾患酵素学研究センター免疫病態研究部門（教授）

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特異的に発現する転写調節因子 AIRE の遺伝子改変マウスを用いて解析した。すなわち、AIRE 遺伝子の発現制御下に蛍光分子マーカー GFP を発現する AIRE/GFP ノックインマウス (AIRE/GFP-KI) を作製し、自己寛容の成立機構における AIRE の役割を解析した。その結果、AIRE は胸腺上皮細胞からの多様な自己抗原の発現と胸腺上皮細胞の細胞構築化の両方の作用を併せ持ち、それによって自己寛容の成立に必要な胸腺微小環境形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

A. 研究目的

胸腺で自己反応性 T 細胞を除去するためには胸腺髄質上皮細胞 (medullary thymic epithelial cell: mTEC) によって多彩な組織特異的自己抗原 (tissue-specific antigen: TSA) が発現され T 細胞に提示されなければならない。mTEC に発現する遺伝性自己免疫疾患の原因遺伝子 AIRE はこのプロセスに関わっていると考えられる。AIRE 依存的な mTEC の TSA 発現機構については現在のところ 2 つの異なるモデルが提唱されている。一つは多様な TSA の発現は mTEC の分化・成熟が進むとともに AIRE 依存的に獲得されるという考え方である (terminal differentiation model)。これに対し、もう一つのモデルでは mTEC による多様な TSA 発現を比較的少数の TSA を発現する多種類の mTEC の総和と捉え、個々の mTEC が発現する TSA の種類は mTEC の分化・成熟ともなまってむしろ減少すると考える (developmental model)。本研究では、mTEC における多様な自己抗原の発現機構に関するこれらのモデルを検証し、自己寛容の成立機構における mTEC および AIRE の役割を明らかにしたいと考え実験を行った。

B. 研究方法

AIRE 遺伝子の発現制御下に蛍光分子マーカー GFP を発現する AIRE/GFP ノックインマウス (AIRE/GFP-KI) を作製した。すなわち、AIRE/GFP-KI では AIRE 発現細胞を GFP 発現細胞として同定でき、それによって AIRE 発現細胞と AIRE 非発現細胞とを明確に区別することができる。AIRE/GFP-KI から FACS sorting によって AIRE 発現 mTEC および AIRE 非発現 mTEC を回収し、mTEC が発現する代表的な TSA である *insulin 2* や *CRP* の発現レベルを定量 PCR 法によって評価した。他方、AIRE/GFP-KI のうち、両アレルに

GFP 遺伝子を挿入し、それによって AIRE 遺伝子をホモで欠損する個体 (*gfp/gfp*) の胸腺組織標本を用いて AIRE 欠損に伴う AIRE 発現 mTEC および AIRE 非発現 mTEC の細胞構築を評価し、AIRE の mTEC 構築化作用についても検討した。

(倫理面への配慮)

全ての実験は徳島大学遺伝子組換え実験安全管理規則、および徳島大学動物実験指針を遵守して行った。また、遺伝子改変マウスは徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部附属動物実験施設内で高いグレードの SPF 環境下で飼育され、実験期間中、微生物モニター検査が定期的に行われた。

C. 研究結果

AIRE/GFP-KI では予測通り、AIRE 発現細胞が GFP によって標識された。すなわち、AIRE/GFP-KI 胸腺の組織切片を抗 GFP 抗体と抗 AIRE 抗体によって二重染色したところ、ほとんど全ての GFP 陽性細胞は AIRE 陽性であった。興味深いことに、AIRE 遺伝子をホモで欠損する個体 (*gfp/gfp*) の胸腺でも GFP 陽性細胞が同程度に認められ、このことから AIRE 自体は AIRE を発現する mTEC の系列決定に関与しないことが明らかになった。次いで、AIRE/GFP-KI (*gfp/+*) および AIRE/GFP-KI (*gfp/gfp*) の AIRE 発現細胞および AIRE 非発現細胞の各分画をソーティングし、*insulin 2* (AIRE 欠損マウス mTEC で発現が低下している、いわゆる AIRE-dependent TSA gene) および *CRP* (AIRE 欠損マウス mTEC で発現が低下していない、いわゆる AIRE-independent TSA gene) の発現を real-time PCR を用いて解析した。その結果、AIRE-dependent TSA gene である *insulin 2* の発現はもっぱら AIRE 発現細胞から正常 AIRE 蛋白質の存在に依存して認められるのに対し、

AIRE-independent TSA gene である *CRP* の発現は AIRE 発現細胞と AIRE 非発現細胞の両方から、正常 AIRE 蛋白質の有無に関わらず検出された。AIRE は終末分化段階にある mTEC で発現しているという最近の報告とも併せ、mTEC における TSA 発現機構として、terminal differentiation model を支持する結果であった。他方、免疫組織染色からは AIRE/GFP-KI (*gfp/gfp*) の AIRE 発現細胞は形態変化（樹状突起を欠く球状 mTEC）と分布異常（皮質・髄質境界領域に密集せず、髄質の中心に密集する傾向）を認めたことから、AIRE が mTEC の細胞構築化に対しても重要なはたらきを持つことが明らかになった。

D. 考察

TSA 発現機構について我々の AIRE/GFP-KI を用いた解析結果は terminal differentiation model を支持したが、同時に AIRE/GFP-KI (*gfp/gfp*) 由来の GFP 陽性細胞の形態と分布が AIRE/GFP-KI (*gfp/+*) のそれとは異なることから、developmental model の考え方の根幹をなす、AIRE が mTEC の細胞構築化作用を持つという視点も正しいと考えられた。以上の知見に基づき、negative selection を実行する細胞の中で AIRE という「分子」のはたらきが重要なのか (terminal differentiation model を支持)、それとも negative selection を担う「細胞」(AIRE 陽性細胞自身の可能性もある) の産生に AIRE が必要なのか (developmental model を支持) を引き続き新たなモデルマウスを作製して検討する必要がある。

E. 結論

AIRE は胸腺上皮細胞からの多様な自己抗原の発現と胸腺上皮細胞の細胞構築化の両方の作用を併せ持ち、それによって自己寛容の成立に必要な胸腺微小環境形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hamazaki, Y., Fujita, H., Kobayashi, T., Choi, Y., Scott, H.S., Matsumoto, M., and Minato, N.
Medullary thymic epithelial cells expressing Aire represent a unique lineage derived from cells expressing claudin
Nature Immunol. 8: 304-311, 2007.
- 2) Matsumoto, M.
Transcriptional regulation in thymic epithelial cells for the establishment of self tolerance
Arch. Immunol. Ther. Exp. 55: 27-34, 2007.
- 3) Matsumoto, M.
Autoimmune regulator functions in autoimmunity control

Expert Rev. Clin. Immunol. 3: 891-900, 2007.

2. 学会発表

- 1) Mouri, Y. and Matsumoto, M.
Aire in thymic stroma controls early thymopoiesis
The Rolduc Workshop on Thymocyte and T cell Biology
Kerkrade, Netherlands, May 20, 2007.
- 2) Yano, M., Mouri, Y. and Matsumoto, M.
Thymic organogenesis controlled by NF- κ B activating factors
FOCiS 2007
San Diego, USA, June 9, 2007.
- 3) Matsumoto, M.
Thymic stromal factors that regulate establishment and maintenance of self-tolerance
RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2007
Development and Maintenance of Immune System
Pacifico Yokohama, Yokohama, July 26, 2007.
- 4) Matsumoto, M.
Transcriptional regulation in the thymus for the establishment of self-tolerance
13th International Congress of Immunology
Rio de Janeiro, Brazil, August 21, 2007.
- 5) Matsumoto, M.
Aire-dependent organization of thymic microenvironment for the establishment of self-tolerance
第 37 回日本免疫学会総会、品川、2007.11.21.
- 6) Niki, S., Mouri, Y., and Matsumoto, M.
Target-organ specificity of autoimmunity defined by Aire
第 37 回日本免疫学会総会、品川、2007.11.22.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

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

AIRE 遺伝子は胸腺髄質上皮細胞（medullary Thymic Epithelial Cells, mTEC）に特異的に発現しており、種々の自己抗原蛋白の mTEC での発現と、それによる自己反応性 T 細胞の除去に必須の遺伝子である。そのため AIRE ノックアウト（KO）マウスにおいては、種々の臓器に対する自己免疫疾患を自然発症する。しかしこれまで、中枢神経系自己免疫疾患への AIRE の関与は、明らかではなかった。本研究の目的は、胸腺でのミエリン蛋白の発現並びに実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）への AIRE の関与を明らかにすることにある。野生型及び AIRE KO マウスより分離した、mTEC におけるミエリン蛋白の発現を比較したところ、ミエリン蛋白の種類により AIRE 依存性と AIRE 非依存性に分けられることが判明した。AIRE 依存性ミエリン蛋白による EAE の重症度は、AIRE KO マウスで有意に強く、AIRE による免疫寛容誘導が、自己免疫反応抑止に重要であることが判明した。AIRE による、ミエリン蛋白への免疫寛容誘導機構の解明は、MS 発症機構の解明に寄与すると考えられる。

A. 研究目的

分担研究者の課題は、胸腺内免疫寛容誘導に欠陥のある AIRE 遺伝子ノックアウト（KO）マウスに、MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）を誘導し、V α 19iT 細胞を用いてこの遺伝子改変マウスの治療実験を行い、治療効果発現機構を解析することである。本年度は、その第一段階として、AIRE KO マウスにおける EAE 誘導実験系を確立した。AIRE 遺伝子は胸腺髄質上皮細胞（medullary Thymic Epithelial Cells, mTEC）に特異的に発現しており、種々の自己蛋白の mTEC による提示に必須の遺伝子である。mTEC が提示する自己蛋白に対して強い反応性を示した胸腺細胞は、細胞死を誘導される（クローン消去）。そのため AIRE KO マウスにおいては、胸腺での自己反応性クローン消去が障害され、種々の臓器に対する自己免疫疾患を自然発症する。しかし、今までのところ、mTEC によるミエリン蛋白の提示並びに EAE の病態への AIRE の関与は解析されていない。これらの点を解明することが本研究の目的である。

B. 研究方法

1) 胸腺内ミエリン抗原の発現測定

野生型および AIRE KO マウスの胸腺から、高純度の mTEC を精製分離し、mRNA を抽出した。定量的 RT-PCR を用いて、種々のミエリン蛋白遺伝子発現レベルを定量した。

2) EAE の誘導

種々のミエリン蛋白ペプチドと完全フロイントアジュバントでエマルジョンを作製し、野生型及び AIRE KO

マウスに免疫した。同時に、百日咳毒素を腹腔内注射し、臨床症状を追跡した。

3) サイトカイン産生量測定

ミエリン蛋白ペプチドと完全フロイントアジュバントのエマルジョンで免疫したマウスの所属リンパ節細胞を、ペプチドで再度刺激し、培養上清中の IFN- γ 、IL-17 濃度を ELISA 法により測定した。

（倫理面への配慮）

実験動物の取り扱いに際しては、国立精神・神経センター神経研究所の実験動物委員会取り扱い指針を遵守し、苦痛を最小限に止めるよう、配慮した。遺伝子組換え動物実験においては、当研究所組換え DNA 実験委員会の承認を得た上で、指針を遵守して行った。

C. 研究結果

1) 胸腺内ミエリン蛋白の、AIRE による発現制御

野生型及び AIRE KO マウス胸腺 mTEC におけるミエリン蛋白遺伝子発現を定量したところ、mTEC に発現するミエリン蛋白には、AIRE 依存性と非依存性のものがあることが判明した。

2) 胸腺内ミエリン蛋白発現と EAE 病態の関連

野生型と AIRE KO マウスを種々のミエリン蛋白で免疫して EAE を誘導したところ、mTEC でのミエリン蛋白の発現量と、EAE 重症度の間には相関があることが判明した。すなわち、AIRE 依存性ミエリン蛋白の場合、AIRE KO マウスでの EAE 重症化を認め、AIRE 非依存性ミエリン蛋白では、野生型との差を認めなかった。EAE 重症化の原因を明らかにするため、免疫したマウスの所属リンパ節細胞を、免疫原で再刺激した際のサイトカイン産生を解析した。その結果、AIRE 依存性ミエ

リン蛋白に対しては、AIRE KO マウスにおいて強いサイトカイン産生が起きていることが判明した。

D. 考察

これまでミエリン蛋白のノックアウトマウスを用いたEAEモデルを用いて、ミエリン蛋白に対する免疫寛容機構が研究されてきた。このようなモデルでは、中枢性と末梢性免疫寛容を区別できない。本研究で、AIRE KOマウスを用いることによって、ミエリン蛋白に対する胸腺内（中枢性）免疫寛容の重要性が明らかとなった。

E. 結論

ミエリン蛋白の mTEC における発現は、ミエリン蛋白の種類により AIRE 依存性と AIRE 非依存性に分けられる。AIRE 依存性ミエリン蛋白による免疫寛容機構は、ミエリン蛋白に対する自己免疫抑制に重要な役割を果たしていると考えられる。したがって、AIRE による、ミエリン蛋白への免疫寛容誘導機構解明は、MS の発症機構の解明に寄与すると考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 佐藤和貴郎、荒浪利昌、山村隆. 2008. ヒトTh17細胞におけるケモカインリセプターの発現. 臨床免疫・アレルギー科 49(1): 89-94.
2. 佐藤和貴郎、荒浪利昌、山村隆. 2007. 自己免疫疾患と Th17 細胞. Neuroimmunology 特集号 15-2: 227-234.
3. Wakiro Sato, Toshimasa Aranami, and Takashi Yamamura. 2007. Cutting edge: Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5- phenotype. J Immunol 178:7525-7529.

2. 学会発表

1. Asako Tagawa, Toshimasa Aranami, Takashi Yamamura. Differential effects of Aire gene deficiency on the development of EAE induced by two representative myelin peptides. Annual Meeting of FOCIS. San Diego, California, USA. 2007 June 8.
2. Toshimasa Aranami, Sachiko Miyake, Masafumi Ogawa and Takashi Yamamura. CD11c on NK cells mirrors the temporal disease activity of multiple sclerosis Annual Meeting of FOCIS. San Diego, California, USA. 2007 June 10.
3. 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総会学術集会. 金沢. 2007年4月12日.

4. 佐藤和貴郎、荒浪利昌、山村隆. Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+ CCR5- phenotype. 第37回日本免疫学会総会学術集会. 東京. 2007年11月22日.
5. 田川朝子、荒浪利昌、山村隆. Differential effects of Aire gene deficiency on the development of autoimmune encephalomyelitis induced by two representative myelin antigens. 第37回日本免疫学会総会学術集会. 東京. 2007年11月22日.
6. 荒浪利昌、佐藤和貴郎、山村隆. Accumulation of highly differentiated CD28null Th1 cells lacking TIM-3 expression in multiple sclerosis. 第37回日本免疫学会総会学術集会. 東京. 2007年11月22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

MR1 拘束性 T 細胞の解析方法の確立に関する研究

分担研究者 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）

研究要旨

MAIT 細胞は腸管免疫をつかさどる重要な細胞であり、自己免疫疾患やアレルギー疾患と MAIT 細胞の関連を調べることは、腸管免疫を柱とする新しい免疫制御機構の解明につながると考えられる。よって本研究では、 $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ T 細胞のより詳細な機能解析を可能にする、 $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ T 細胞受容体特異的抗体産生細胞の取得と、抗 $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ モノクローナル抗体作製を目的とした。 $V\alpha 19$ 環状ペプチドあるいは $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ T 細胞受容体陽性 T 細胞ハイブリドーマを用いて免疫を行い、ターゲットエピトープの高次構造の保持に配慮して研究を進めたが、複数のスクリーニング法を経て得られた抗体は、いずれも $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ T 細胞受容体の相補性決定部位を認識するものではなかった。免疫法、スクリーニング法それぞれにさらなる改良が必要であると考えられた

A. 研究目的

マウス MR-1 拘束性 T 細胞 (MAIT 細胞) は第二の NKT 細胞と呼ばれる T 細胞で、 $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ の均一な α 鎖からなる T 細胞受容体を介して、MHC 類縁分子である MR-1 上に提示された未知の抗原を認識する。ところが MAIT 細胞の特異的な検出法は未だ不十分で、 $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ 特異的プライマーを用いた PCR 法が唯一の方法である。そこで、MAIT 細胞の詳細な機能解析を可能にする抗 $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ モノクローナル抗体作製を目的として研究を進めた。

B. 研究方法

T 細胞受容体上の相補性決定領域 (CDR) と呼ばれる配列は、エピトープに対する反応性に関与する重要な領域で、一つの T 細胞受容体分子に内在する複数の相補性決定領域が協同的に作用して、抗原の一種類のエピトープを認識する。それぞれの相補性決定領域が特徴的なループ構造を形成し、一つのエピトープを挟み込むような形で相互作用するため、抗体が抗原としての相補性決定領域を正しく認識するためには、このループ構造が保持された抗原を用いて免疫を行うことが極めて重要である。そこで今回は 2 種類の抗原をそれぞれ用意し、免疫を行った。第一の免疫原として、 $V\alpha 19$ 環状ペプチド (CAVKDSNYQLIWGACG) の KLH コンジュゲートを、CFA エマルジョンとして MR-1 欠損マウスに計 3 回腹腔内投与した。また第二の免疫原として、 $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$ T 細胞受容体を発現する T 細胞ハイブリドーマ NB116 (FEBS letters 516, 97 (2002)) 細胞を、MR-1 欠損マウスに腹腔内投与 (4 回) し、さらに同細胞を静脈内投与 (2 回) し追加免疫を行った。免疫終

了後にそれぞれ脾臓細胞を分離し、ポリエチレングリコールを用いてミエローマ細胞 (P3U1 細胞) と細胞融合させ、HAT 培地中にて選択培養を行った。

(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

細胞融合後、HAT 培地中にて選択培養を行い、増殖してきた各ウェルの培養上清を用いてスクリーニングを行った。一次スクリーニングとしてフローサイトメーターを用いて NB116 細胞に反応するサンプルを選別し、ペプチド免疫分については 29 個、ハイブリドーマ免疫分については 803 個の陽性ウェルを得た。二次スクリーニングとしてペプチド免疫分についてはフローサイトメーターによるスクリーニング再度行い、5 個の陽性ウェルを得た。またハイブリドーマ免疫分については $V\alpha 19$ ペプチドを用いた ELISA 法によるスクリーニングを経て、79 個の陽性ウェルを得た。ハイブリドーマ免疫分について、アロ抗原特異的抗体を除去するための三次スクリーニングとして、NB116 細胞に加えてハイブリドーマ作製に用いた NB116 細胞の親株細胞 (BW5147 細胞) と $V\alpha 14$ - $J\alpha 18$ T 細胞受容体を発現する T 細胞ハイブリドーマ (N38-3C3 細胞) をそれぞれ用意し、NB116 細胞に反応し、BW5147 細胞および N38-3C3 細胞とは反応しない抗体を選別した。その結果、ハイブリドーマ免疫分のみ 10 個のウェルが選別された。このうち 4 ウェルについて、限界希釈法によりクローニングを行い、それぞれ 5 クローン (計 20 クローン) を得た。

得られた各クローンについて、精製後サブクラスの同定を行った結果、IgG1/ κ が1種、IgG2a/ κ が1種、IgG2b/ κ が2種得られた。これらの抗体について、C57BL/6 マウス、V α 19TCRtg マウスあるいはMR-1 欠損マウスの脾臓細胞をと反応させ、FACS にて解析した。C57BL/6 マウスと V α 19TCRtg マウスについては、それぞれ陽性細胞と陰性細胞を AutoMACS を用いて分離し、定量 PCR を用いて V α 19 転写産物の定量を行ったが、陽性画分への V α 19 の集積は認められなかった

D. 考察

今回、第二の NKT 細胞と言われる V α 19-J α 33 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。ペプチド抗原を免疫した場合、用いたエピトープに対して相同性の高いアミノ酸配列を有するタンパク質と交差反応をすることがあるため、今回得られた抗体も何らかのタンパク質と交差反応しているものと考えられた。また均一であると想定した NB116 細胞が二峰性の染色パターンを示したことから、リクローニングをする必要があると考えられた。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、V α 19-J α 33 T 細胞受容体 T 細胞ハイブリドーマ NB116 細胞と反応し、ELISA 法により、V α 19 ペプチドと反応し、NB116 細胞作製に用いた親株 BW5147 細胞とは反応せず、V α 14-J α 18 T 細胞受容体を発現する N38-3C3 細胞とは反応しなかった。この結果、得られた抗体は少なくとも 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、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 法により比較し、抗体反応性 T 細胞をクローニングし、T 細胞受容体の遺伝子配列を DNA シーケンシングにて確認する、などの手法を追加する必要があると考えられた。

E. 結論

V α 19-J α 33 T 細胞のより詳細な機能解析を可能にする、V α 19-J α 33 T 細胞受容体特異的モノクローナル抗体作製を目的とした。ターゲットエピトープの高次

構造の保持に配慮して研究を進めたが、得られた抗体は、いずれも V α 19-J α 33 T 細胞受容体の相補性決定部位を認識するものではなかった。免疫法、スクリーニング法それぞれにさらなる改良が必要であると考えられた

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Activation of invariant Natural Killer T cells by synthetic glycolipid ligands suppresses autoantibody-induced arthritis.
Shinjiro Kaieda, Chiharu Tomi, Shinji Oki, Takashi Yamamura, Sachiko Miyake
Arthritis & Rheum. 56, 1836-1845 (2007)

2) Invariant NKT cells Biased for IL-5 Production Act as Crucial Regulators of Inflammation.
Kaori Sakuishi, Shinji Oki, Manabu Araki, Steven A. Porcelli, Sachiko Miyake, Takashi Yamamura
J. Immunol. 179, 3452-3462 (2007)

2. 学会発表

[国際学会]

1) Shinji Oki, Mayumi Fujita, Takao Ootsuka, Miho Mizuno, Chiharu Tomi, Shinjiro Kaieda, Takashi Yamamura, Sachiko Miyake: Functional analysis of carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 in experimental autoimmune encephalomyelitis
7th Annual Conference of FOCIS, San Diego, Jun. 10th, 2007

2) Yoshimitsu Doi, Shinji Oki, Sachiko Miyake, Takashi Yamamura: Functional involvement of NR4A2 in the pathogenesis of multiple sclerosis
7th Annual Conference of FOCIS, San Diego, Jun. 10th, 2007

3) Toru Yago, Ryosuke Tajima, Shinjiro Kaieda, Shinji Oki, Takashi Yamamura, and Sachiko Miyake
MRI-restricted Va19i T cells ameliorate murine models of arthritis
2007 Annual Scientific Meeting of ACR, Boston, Nov. 9, 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年4月12日

2) 田島良亮、海江田信二郎、大木伸司、三宅幸子
抗体誘導関節炎におけるNKT細胞の機能解析 第51回日本リウマチ学会総会・学術集会・第16回国際リウマチシンポジウム(横浜) 2007年4月26日

3) 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総会・学術集会・第16回国際リウマチシンポジウム(横浜) 2007年4月26日

4) 土居芳充、大木伸司、三宅幸子、山村 隆
Functional Involvement of NR4A2 in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis 第20回内藤コンファレンス(神奈川) 2007年10月11日

5) 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総会(大阪) 2007年10月19日

6) 横手裕明、J. Ludovic Croxford、水沢英洋、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総会(大阪) 2007年10月19日

7) 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ールT細胞内タンパク質の解析 第37回日本免疫学会総会・学術集会(東京) 2007年11月20日

8) 横手裕明、J. Ludovic Croxford、水沢英弘、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回日本免疫学会総会・学術集会(東京) 2007年11月22日

9) 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回日本免疫学会総会・学術集会(東京) 2007年11月21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

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 (平成 19 年度)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	論文全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>Miyake, S. and T. Yamamura</u>	NKT cells and autoimmune diseases: Unraveling the complexity. In T cell activation by CD1 and lipid antigens.	Branch D. Moody	Current Topics in Microbiology and Immunology	Springer-Verlag	New York, USA	2007	314:251-267

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
<u>Kaieda, S., S. Oki, C. Tomi, T. Yamamura and S. Miyake</u>	Activation of invariant natural killer T cells by synthetic glycolipid ligands suppresses autoantibody-induced arthritis.	Arthr. Rheumat.	56	1836-1845	2007
<u>Sato, W., T. Aranami, and T. Yamamura</u>	Cutting Edge: Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5-phenotype.	J. Immunol.	178	7525-7529	2007
<u>Sakuishi, K., S. Oki, M. Araki, S.A. Porcelli, S. Miyake, and T. Yamamura</u>	Invariant NKT cells biased for IL-5 production act as crucial regulators of inflammation.	J. Immunol.	179	3452-3462	2007
<u>Ambosino, E., M. Terabe, R.C. Halder, J. Peng, S. Takaku, S. Miyake, T. Yamamura, V. Kumar, and J.A. Berzofsky</u>	Cross-regulation between type I and type II NKT cells in regulating tumor immunity: A new immunoregulatory axis.	J. Immunol.	179	5126-5136	2007
<u>Yamamura, T., K. Sakuishi, Zs. Illes, and S. Miyake</u>	Understanding the behavior of invariant NKT cells in autoimmune diseases.	J. Neuroimmunol.	191	8-15	2007
<u>Michio Shimamura, Yi-Ying Huang, Naoki Okamoto, Nahoko Suzuki, Jouji Yasuoka, Kenji Morita, Akira Nishiyama, Yuusuke Amano, and Tadashi Mishina</u>	Modulation of V α 19 NKT cell immune responses by α -mannosyl ceramide derivatives consisting of a series of modified sphingosine.	Eur. J. Immunol.	37	1836-1844	2007
<u>Michio Shimamura, Yi-Ying Huang, Naoki Okamoto, Yutaka Watanabe, Yoshiko Murakami, Taroh Kinoshita, Yoshio Hirabayashi, Chikara Murakata, Yukishige Ito, and Tomoya Ogawa,</u>	Glycolipids with nonreducing end α -mannosyl residues that have potentials to activate invariant V α 19 NKT cells.	FEBS. J.	274	2921-2932	2007
<u>Hamazaki, Y., Fujita, H., Kobayashi, T., Choi, Y., Scott, H.S., Matsumoto, M., and Minato, N</u>	Medullary thymic epithelial cells expressing Aire represent a unique lineage derived from cells expressing claudin	Nature Immunol.	8	304-311	2007
<u>Matsumoto, M</u>	Transcriptional regulation in thymic epithelial cells for the establishment of self tolerance	Arch. Immunol. Ther. Exp.	55	27-34	2007

IV. 研究成果の刊行物・別刷

NKT Cells and Autoimmune Diseases: Unraveling the Complexity

S. Miyake (✉) · T. Yamamura

Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP, 4-1-1,
Ogawahigashi, Kodaira, 187-8502 Tokyo, Japan
miyake@ncnp.go.jp

1	Introduction	251
2	The Role of NKT Cells in Animal Models of Autoimmune Diseases	252
2.1	NKT Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis	252
2.2	NKT Cells in Diabetes Models	256
2.3	NKT Cells in Arthritis Models	257
2.4	NKT Cells in Lupus Models	259
2.5	NKT Cells in Colitis	260
3	NKT Cells in Human Autoimmune Diseases	260
4	Concluding Remarks and Future Research	261
	References	262

Abstract CD1d-restricted invariant natural killer T (NKT) cells emerge as unique lymphocyte subsets implicated in the regulation of autoimmunity. Abnormalities in the numbers and functions of NKT cells have been observed in patients with diverse autoimmune diseases as well as in animal models of autoimmune diseases. NKT cells recognize glycolipid antigens presented by the nonpolymorphic MHC class I-like protein CD1d and participate in various kinds of immunoregulation due to a potent ability to produce a variety of cytokines. In this review, we examine the potential roles of NKT cells in the regulation and pathogenesis of autoimmune disease and the recent advances in glycolipid therapy for autoimmune disease models.

1 Introduction

Autoimmunity is not forbidden in the healthy immune system and may target peptide or lipid antigens. However, in most healthy individuals, autoimmunity does not manifest its dangerous nature, but rather it plays an essential role in maintaining the immunological homeostasis as a physiological regulator. As

evidenced by a number of studies of autoimmune disease models, “dangerous” autoimmunity appears to be controlled by “protective” autoimmunity in the physiological immune network [1, 2].

Although the functional dichotomy of autoimmunity has been documented mostly in peptide and MHC-reactive T cells, it may also hold true for lipid-specific T cells. In fact, opposing functions mediated by lipid-reactive, CD1-restricted T cells have been documented in recently published studies on autoimmune disease models [3–8] (Table 1). Namely, CD1d-restricted invariant $V\alpha 14^+$ NKT cells (*NKT*) play a protective role in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) or type I diabetes in NOD mice, whereas they appear to be involved in mediating the inflammatory pathology of arthritis models. Whatever mechanism may be operative in polarizing *NKT* cells toward being protective or pathogenic, it is obvious that autoimmunity to lipid antigens is not always beneficial for our health. Here we review the recent publications on lipid-reactive T cells, particularly CD1d-restricted *NKT* cells and autoimmune diseases.

2

The Role of NKT Cells in Animal Models of Autoimmune Diseases

2.1

NKT Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

After transgenic mice overexpressing or lacking $V\alpha 14$ – $J\alpha 18$ T cell receptors (TCRs), which define invariant NKT cells, were established, the role of CD1d-restricted *NKT* cells was studied in depth in various autoimmune conditions. Amongst these, EAE is a prototypical model for multiple sclerosis (MS) mediated by Th1 autoimmune cells, which can be induced by immunization with central nervous system (CNS) antigens such as myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) or myelin basic protein (MBP) in mycobacterium-containing adjuvant. Approximately 2–3 weeks after sensitization, susceptible mice would manifest MS-like ascending limb paralysis due to inflammatory lesions within the brain and spinal cord. However, as seen with human MS, EAE mice usually recover from paralysis, which is thought to involve elaborate immune regulatory processes. Several research groups have investigated the possible involvement of *NKT* cells in the regulation of EAE using transgenic or gene knockout mice. In TCR $V\alpha 14$ – $J\alpha 18$ transgenic NOD mice, bearing an increased number of *NKT* cells, MOG-induced EAE was significantly suppressed in association with inhibition of antigen-specific IFN- γ production in the spleen [9]. Consistent with this, another study showed that CD1d^{-/-} mice developed a more severe EAE compared to C57BL/6 mice [10], suggesting the

Table 1 iNKT cells in autoimmune disease models

The role of iNKT cells in autoimmune disease models	Effect of glycolipid ligand on disease
Type I diabetes	
NOD mice	NOD mice
Protection by transfer of NKT enriched thymocytes	Protection by α -GalCer [24, 25, 29, 30]
Protection in V α 14 J α 18Tg	Protection by OCH [31]
Protection in CD1Tg	
Exacerbation in CD1 KO	
Transfer of BDC2.5 T cells	Transfer of AI4 T cells
Protection by increase of iNKT cells	Protection by α -GalCer [34]
Transfer of AI4 T cells	
Exacerbation by increase of iNKT cells	
Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)	
Protection in V α 14 J α 18Tg/NOD	MOG-induced EAE in C57BL/6 [15]
Exacerbation in CD1 KO	Protection by OCH [11-13]
No difference in CD1 KO	Protection by α -GalCer co-immunization
No difference in J α 18 KO	MBP-induced EAE in B.10PL [13]
Protection in CD1 KO(C57BL/6,B10.PL.)	Protection by α -GalCer pretreatment [11]
	MBP-induced EAE in PL/J
	Protection by α -GalCer co-immunization [11]
	MBP-induced EAE in SL/J
	Exacerbation by α -GalCer co-immunization [11, 13]

Table 1 (continued)

The role of iNKT cells in autoimmune disease models	Effect of glycolipid ligand on disease
Arthritis models	
Collagen-induced arthritis	
Protection in J α 18 KO	CIA in C57BL/6 Protection by OCH [39]
Protection by anti-CD1d mAb	CIA in SJL Protection by OCH [39]
Antibody-induced arthritis	
Protection in J α 18 KO	[37, 41]
Protection in CD1 KO	[37]
Lupus models	
MRLlpr/lpr	
Exacerbation of dermatitis in CD1 KO	Dermatitis in MRLlpr/lpr Protection by α -GalCer [52]
No difference in dermatitis in CD1 KO	Nephritis in MRLlpr/lpr [51]
No difference in nephritis in CD1 KO	No effect by α -GalCer [52]
Pristane-induced nephritis	Pristane-induced nephritis in Balb/c Protection by α -GalCer [53]
Exacerbation in CD1 KO	Pristane-induced nephritis in SJL/J Exacerbation by α -GalCer [53]
Nephritis in (NZBxW)F1	
Protection by anti-CD1d mAb	Nephritis in (NZBxW)F1 Exacerbation by α -GalCer [56]
Inflammatory bowel disease model	
Oxazolone-induced protection in J α 18 KO	Dextran sodium sulfate-induced colitis Protection by α -GalCer [57]
Protection in CD1 KO or J α 18 KO	Protection by OCH [58]

KO, knockout mice; Tg, transgenic mice

immunoregulatory role of NKT cells. We could not rule out the possibility that NKT cells take the space of pathogenic MHC-restricted T cells. Other groups, however, reported that there was no difference in disease course between wild type and mice lacking all CD1d-restricted T cells (CD1d^{-/-}) or selectively lacking invariant NKT cells (J α 18^{-/-}) [11, 12] in ameliorating disease in C57BL/6, CD1d^{-/-} and B10.PL.CD1d^{-/-} mice [13]. Although the basis for these inconsistencies is not clear, it is possible that the role of NKT cells in each EAE system is critically determined by various ill-defined factors such as non-MHC genes that result from different levels of back-crossing to the C57BL/6 background, the breeding environment (cleanliness, serenity), or dose and quality of adjuvant used for EAE induction.

After α -galactosylceramide (α -GalCer) was identified as the efficacious glycolipid ligand for NKT cells, this glycolipid was widely used as a pharmacological reagent to explore the potential for NKT cells to regulate autoimmunity. The results obtained from α -GalCer treatment of EAE also generated conflicting results. Intraperitoneal injection of α -GalCer before immunization led to suppression of EAE in B.10 PL mice induced with a peptide from MBP [13]. Co-immunization of α -GalCer with an encephalitogenic MOG peptide ameliorated EAE induced in C57BL/6 mice, as compared to MOG immunization without α -GalCer [13]. This co-immunization protocol was adopted by others and proved effective in suppressing EAE in MBP-immunized PL/J mice [11, 12]. However, exacerbation of EAE was observed by a similar co-immunization with α -GalCer in MBP-immunized B10.PL and SJL/L mice [11, 12].

Accompanying *ex vivo* analysis showed that the protective effect of α -GalCer seemed to correlate with the differential abilities of the mouse strains to produce IL-4 upon stimulation with α -GalCer. For, example, protection was seen in strains secreting higher levels of IL-4 in response to α -GalCer. Moreover, the protective effect of α -GalCer in EAE was not observed in IL-4- or IL-10-deficient mice [11], whereas disease was ameliorated in IFN- γ -deficient mice [13, 14]. Taken together, this suggests that EAE protection by α -GalCer is mediated by Th2 cytokines produced by NKT cells, although one study demonstrated that IFN- γ but not IL-4 is critical for the disease protection by α -GalCer in C57BL/6 mice [13]. Another line of evidence to support Th2-mediated protection is that *in vivo* injection of α -GalCer-pulsed antigen-presenting cells (APCs) with CD86 blockade (treated with anti-B7.2 antibodies does not only polarize NKT cells toward a Th2-like phenotype but mediates concomitant suppression of EAE, whereas α -GalCer presented by anti-CD40 activated APC induces a bias of NKT cells toward a Th1-like phenotype and exacerbated EAE [14].

Further support for Th2-mediated suppressive effect on EAE by NKT cells has been shown using OCH, a sphingosine truncated analog of α -GalCer,

which preferentially induces IL-4 from NKT cells [15–18]. OCH has been shown to be more effective than α -GalCer in preventing EAE in C57BL/6 mice, and it possesses some efficacy even when treatment was initiated several days after EAE induction. OCH was also effective when administered orally, which is the favored treatment route for humans. The protective effect by OCH was abrogated by neutralization of IL-4 [15].

Taken together, NKT cells appear to work as a regulatory cells in EAE and a proper activation of NKT cells could lead to amelioration of EAE.

2.2

NKT Cells in Diabetes Models

Nonobese diabetic (NOD) mice develop spontaneous autoimmune diabetes that is similar to the human disease, insulin-dependent type 1 diabetes mellitus. In parallel with effector cells such as Th1 type CD4⁺ cells and CD8⁺ T cells, regulatory cells including NKT cells have been suggested to inhibit the development of diabetes. While a deficit in the number and function of NKT cells has been indicated in NOD mice [19–22], further deletion of NKT cells by genetic ablation expression accelerated onset and increased incidence of diabetes [23–25]. Protection against diabetes in transgenic NOD mice overexpressing CD1d molecules within the pancreatic islets further supports a CD1d-dependent regulatory function of NKT cells [26].

Consistent with the hypothesis that NKT cells are protective in experimental models of diabetes, NOD mice were also protected against diabetes by increasing the number of NKT cells either by infusion of NKT cell-enriched thymocyte preparations [27] or by the introduction of the V α 14 J α 18 gene into NOD mice [28]. Moreover, activation of NKT cells with synthetic glycolipid ligands such as α -GalCer or OCH has been shown to prevent the development of diabetes in NOD mice [24, 25, 29–31].

In many studies, protection from diabetes by NKT cells is associated with the induction of Th2 response to islet autoantigens. Neutralization of IL-4 and IL-10 abolished the protection from diabetes by transferred CD4⁻CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺ (NKT) thymocytes [27]. In V α 14 J α 18 transgenic mice, the response to the pancreatic autoantigen, glutamic acid decarboxylase (name autoantigen) response was shifted toward Th2 phenotype and neutralization of IL-4 abrogated protection from cyclophosphamide-induced diabetes [32]. Th2 polarization was also observed in mice treated with glycolipid ligands for NKT cells [24, 25, 29–31]. Treatment with α -GalCer ameliorated cyclophosphamide-induced diabetes in an IL-4-dependent manner [32], though the role of IL-10 is controversial [30, 32]. Th2-independent mechanisms underlying NKT cell-mediated suppression have been reported in a dif-