

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、また野生型マウスに  $V\alpha 19$ NKT 細胞を移入しておくことにより同様の病状の抑制がもたらされた (Croxford ら、2006 年)。 $V\alpha 19$ NKT 細胞がどのような機構で免疫系ホメオスタシスをもたらし EAE 抑制に寄与しう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 細胞の培養中での TCR 刺激に応答したサイトカイン分泌の分析

$V\alpha 19$  Tg (TCR C $\alpha$  遺伝子欠損 B6 バックグラウンド)、non-Tg (B6)、および  $\beta 2$ -microglobulin 遺伝子欠損 ( $\beta 2m^{-/-}$ 、B6 バックグラウンド) マウスから肝臓単核球細胞を密度勾配遠心法で調製した。これらを固相化抗 CD3 抗体 (2C11, シダレーン社製、0.016~10  $\mu$ g/ml) による刺激下で培養し、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。

(2)  $V\alpha 19$  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、non-Tg (B6)、CD1 $^{-/-}$ あるいは  $\beta 2m^{-/-}$  マウスから調製した肝臓単核球細胞を種々の糖脂質の存在で培養し、上清中のサイトカインを ELISA 法で定量した。ヒト B リンホーマ Raji へのマウス MRI 遺伝子導入細胞株を抗原提示に用いる実験も行った。糖脂質は Birmingham University の Petr Illarionov 博士および田辺三菱製

薬の三品正博士から供与を受けた。

## (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 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

昨年度  $V\alpha 19$ NKT 細胞は培養中で固相化抗 CD3 抗体の濃度を段階的に変化させ TCR への刺激の強さを調節すると、ある一定の刺激範囲では Th2 サイトカインの産生が優先することを見出した。今回  $V\alpha 19$ NKT 細胞のサイトカイン分泌能を  $V\alpha 14$ NKT 細胞と比較しつつさらに詳細な検討を加えた。実験では反応細胞として、30%の  $V\alpha 19$ NKT 細胞および 20%の NK1.1 $^{-}$   $V\alpha 19$ Tg $^{+}$ 細胞を含むが  $V\alpha 14$ NKT 細胞は含まない  $V\alpha 19$ Tg TCR  $\alpha^{-/-}$ マウス細胞、 $V\alpha 14$  NKT 細胞を 30%含むが  $V\alpha 19$ NKT 細胞は約 1% 程度と推測される B6 マウス細胞、および  $V\alpha 19$ NKT 細胞、 $V\alpha 14$ NKT 細胞を含まない  $\beta 2m^{-/-}$ マウス細胞につき免疫応答を検討した。TCR 刺激に用いる抗 CD3 抗体の濃度を 0.016~10  $\mu$ g/ml に段階的に変化させて刺激の強さを調節し、各細胞を 1~2 日培養後の上清中のサイトカインの濃度を測定した。 $V\alpha 19$ 、 $V\alpha 14$ NKT 細胞自身の寄与を明確にするため  $V\alpha 19$ Tg および B6 細胞のサイトカイン産

生を  $\beta$  2m<sup>-</sup>/細胞との比較で示したのが図 1 である。これより以下の諸点が明らかにされた。(i) 培養 1 日目のサイトカイン分泌に反映される TCR 刺激に対する即時的応答による免疫調節サイトカインの分泌は  $V\alpha$  19,  $V\alpha$  14NKT 細胞ともに刺激強度範囲すべてにわたり観察されたが、ここで IFN- $\gamma$  に対する IL-4 優位の分泌が明らかになった。(ii) 継続的の刺激による遅い免疫応答では一定以下の強さの刺激における IL-4, IL-5, IL-10 の IFN- $\gamma$  に対する優先的分泌が見られ、それは  $V\alpha$  19NKT 細胞において特に顕著であった。(iii) IL-17 の分泌に関して、 $V\alpha$  19NKT 細胞は  $V\alpha$  14NKT 細胞と比較してそれ自身の即時的分泌および共存細胞による分泌誘導能が高い。しかし TCR 刺激の弱い領域では IL-17 の分泌は減弱した。

## (2) $V\alpha$ 19 NKT 細胞の糖脂質刺激による免疫応答

これまでに  $V\alpha$  19NKT 細胞は非還元末端に  $\alpha$ -Man 基を有する糖脂質に活性化されることを見出し、 $\alpha$ -ManCer のセラミド部位にフェニル基を導入した化合物 ( $\alpha$ -ManCer4Ph)、ひきつづいて昨年度ピロリ菌が産するコレステロール配糖体をもとに設計したコレステロールの  $\alpha$ -Man 配糖体を見出した。今回さらに微生物由来の 2 種の糖脂質の活性を検討した (図 2)。放線菌の 1 種 *Saccharopolyspora* 由来の糖脂質は  $\alpha$ -Man1-3- $\alpha$ -Man-monoacylglycerol 構造を骨格とするが、還元末端  $\alpha$ -Man 基 6 位は acyl 化され、そのため分子内に 2 本の長鎖炭化水素鎖を持つ。これは抗原提示 MHC 分子

MRI 遺伝子導入細胞に取り込ませると  $V\alpha$  19NKT 細胞を刺激して IL-4, IFN- $\gamma$  の産生を誘導した。一方 *Staphylococcus aureus* 由来糖脂質は  $\beta$ -Man 基を非還元末端に有しその 1,6 位がエステル化され、やはり分子内に 2 本の炭化水素鎖を有する。しかしこの糖脂質には  $V\alpha$  19NKT 細胞刺激能は見出されなかった。このことから  $V\alpha$  19NKT 細胞活性化剤としての  $\alpha$ -Man 基要求性がここでも支持された。*Saccharopolyspora* 由来糖脂質の活性を従来から見出されていた  $\alpha$ -ManCer4Ph、コレステロール  $\alpha$ -Man 配糖体と比較した。その結果  $V\alpha$  19NKT 細胞に対する刺激能は実験ごとにばらつきが見られ、現在の時点で 3 者に大きな相違を認めていない。しかし以下の諸点が示唆された。

(i) *Saccharopolyspora* 由来糖脂質では IFN- $\gamma$  と比較して IL-4 産生誘導が優勢であった。(ii) 同時にアッセイした B6 細胞および CD 1<sup>-</sup>/細胞の結果から予測される  $V\alpha$  14NKT 細胞の免疫応答は *Saccharopolyspora* 由来糖脂質およびコレステロール  $\alpha$ -Man 配糖体刺激による  $V\alpha$  19NKT 細胞の応答より大きかったが、 $\alpha$ -ManCer4Ph 刺激に対するものはわずかであった。 $V\alpha$  14NKT 細胞は従来非還元末端に  $\alpha$ -Gal 基を持つ糖脂質のいくつかに CD 1 依存的に強力な刺激を受けることが知られていたが、そのような糖脂質の脂質部位を成すセラミドやジアシルグリセロールが本研究で用いた糖脂質におけるような変則的な構造に置き換えると  $\alpha$ -Man 基でも遜色ない免疫応答を示した。なお  $\beta$ -Man 基を有する *Staphylococcus aureus* 由

来糖脂質には応答しなかった。(iii) コレステロール  $\alpha$ -Man 配糖体は  $\beta$ 2m-/-細胞に対しても IFN- $\gamma$  産生優先の免疫応答を誘導した。

#### D. 考察

V $\alpha$ 19NKT 細胞の *in vitro* での TCR への刺激に応答したサイトカイン分泌能の検討から suboptimal な刺激条件下で Th2 サイトカインの分泌が優先し得ることが示された。このような擬似刺激に相当する刺激を V $\alpha$ 19NKT 細胞に与える抗原を生理的環境から見出すこと、および抗原提示細胞となる細胞種の検討とそれにおける MR1 発現制御の解明が生体内で Th2 優位の免疫応答誘導の実現に必要である。

V $\alpha$ 19NKT 細胞は V $\alpha$ 14NKT 細胞と比較して高い IL-17 産生能が示唆される。TCR への刺激の強さを減弱した条件で IL-17 の産生が減少するため、この強度の TCR 刺激領域での Th2 優位な免疫応答の誘導は実現可能である。しかし V $\alpha$ 19NKT 細胞を特徴づける機能がこのサイトカイン分泌能に帰される可能性もあり、更なる検討が必要である。

V $\alpha$ 19 NKT 細胞の活性化剤として新たに *Saccharopolyspola* 由来の糖脂質が見出された。これは IL-4 優勢な免疫応答を V $\alpha$ 19 NKT 細胞から誘導する特徴があるが、同時に V $\alpha$ 14NKT 細胞の強力なアゴニストでもある。V $\alpha$ 14NKT 細胞がこの糖脂質により誘導される免疫応答は  $\alpha$ -GalCer によりもたらされるものと IL-4/IFN- $\gamma$  産生の比率

に大差なかった。V $\alpha$ 14NKT 細胞の  $\alpha$ -GalCer に対する免疫応答はこれのスフィンゴシン部位の鎖長を調節した OCH に変換することにより Th2 優位にシフトすることが報告されている(山村ら、2001年)。またセラミド部位への phenyl 基の導入は CD1 による  $\alpha$ -グリコシルセラミドの提示を阻害する。したがって *Saccharopolyspola* 由来の糖脂質をもとに生体内で Th2 の免疫応答を誘導する活性化剤を得るにはこれの炭化水素鎖の鎖長を調節して V $\alpha$ 14NKT 細胞にも Th2 優位の応答を誘導することや phenyl 基を導入する等の修飾を施して V $\alpha$ 14NKT 細胞の免疫応答を減じることが有効となる可能性がある。コレステロール  $\alpha$ -Man 配糖体は NKT 細胞以外の細胞の活性化を誘導し、特異的活性化剤として不向きである。

#### E. 結論

V $\alpha$ 19NKT 細胞のサイトカイン分泌は TCR への抗原刺激に依存して多様性があり、生体内でこの細胞による Th2 免疫応答を優先的に誘導しうることを示唆された。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 $\alpha$ 19 TCR 発現細胞の機能を発揮させるために実効性のある活性化物質や抗原提示細胞での MR1 の発現制御の方法を見いだすことが有効な治療法開発につながると考えられる。

#### F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Localization of NK1.1<sup>+</sup> invariant V $\alpha$ 19 TCR<sup>+</sup> cells in the liver with potential to promptly respond to TCR stimulation.  
Michio Shimamura, Yi-Ying Huang, Rika Migishima, Minesuke Yokoyama, Takako Saitoh and Takashi Yamamura  
*Immunol. Lett.*, **121**: 38-44 (2008)
2. Non-reducing end  $\alpha$ -mannosylated glycolipids that have potential to activate invariant V $\alpha$ 19 NKT cells.  
Michio Shimamura.  
*Carbohydr. Res.*, **343**: 2010-2017 (2008)
3. Altered production of immunoregulatory cytokines by invariant V $\alpha$ 19 TCR bearing cells dependent on the duration and intensity of TCR engagement.  
Michio Shimamura, Yi-Ying Huang, Masumi Kobayashi and Hiroshi Goji  
*Int. Immunol.*, **21**:179-185 (2009)
4. Invariant V $\alpha$ 19 TCR 発現細胞のサイトカイン分泌能と免疫系制御  
島村道夫、  
*臨床免疫・アレルギー科*, **49**: 371-376 (2008)
5. Glycolipid stimulators for NKT cells bearing invariant V $\alpha$ 19-J $\alpha$ 33 TCR  $\alpha$  chain.  
Michio Shimamura  
*Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **8**:285-288 (2008)
6. Activation of Invariant V $\alpha$ 19-J $\alpha$ 33 TCR  $\alpha$ -bearing Cells by Stimulation with certain  $\alpha$ -

mannosylated glycolipids.

Michio Shimamura,

Glycobiology Research Trends, Nova Science Publishers, New York, (*in press*)

### 2. 学会発表

1. *Helicobacter pylori* の産生するコレステロールグリコシド誘導体による V $\alpha$ 14 NKT 細胞の特異的活性化  
島村道夫、遠藤伸、Petr A. Illarionov  
日本分子生物学会 / 日本生化学会合同集会, 神戸, 12月, 2008
2. Specific activation of murine and human NKT cells with cholesterol glycosides produced by *Helicobacter pylori*.  
Michio Shimamura, Petr Illarionov, Shin Endo, Yi-Ying Huang, Abel Singh, Apoorva Bhatt, Gurdayl S. Besra, Janneke Maaskant, Ben J. Appelmelk, Hye Young Kim, Muriel Pichavant, and Dale T. Umetsu, The 5<sup>th</sup> International Symposium on CD1/NKT cells, Kamakura, March, 2009

## 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。

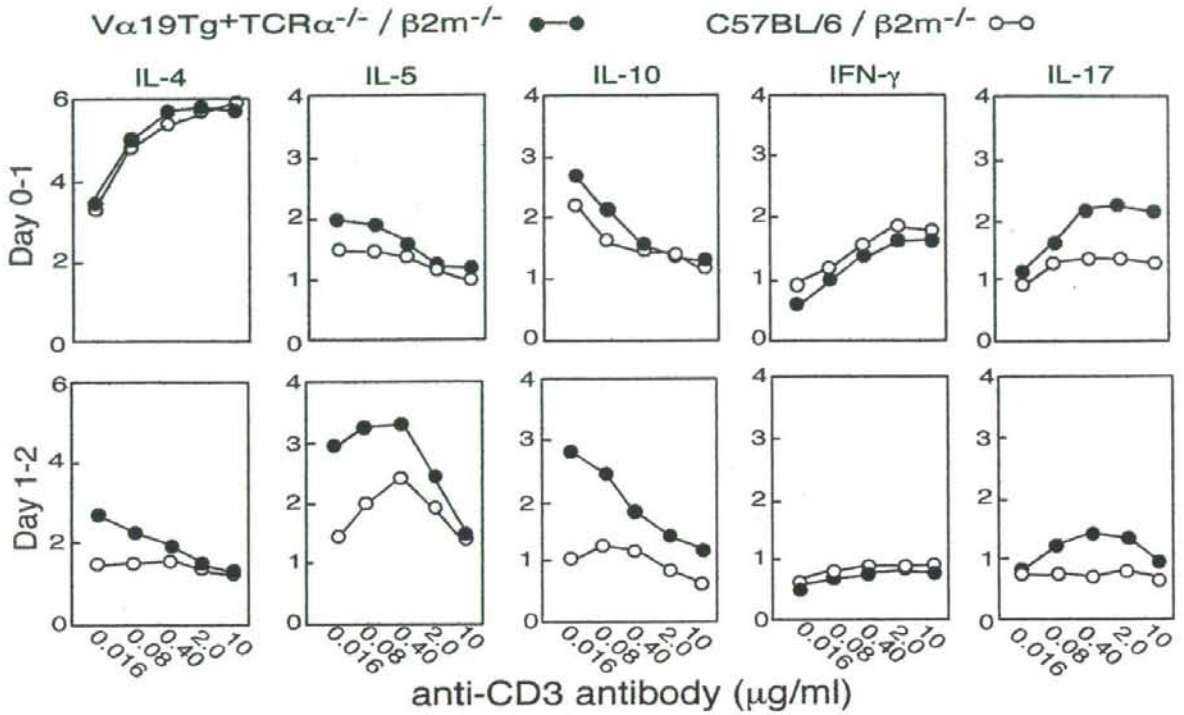
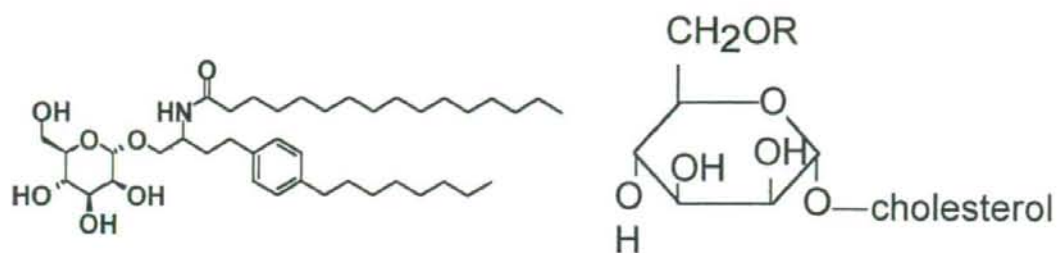
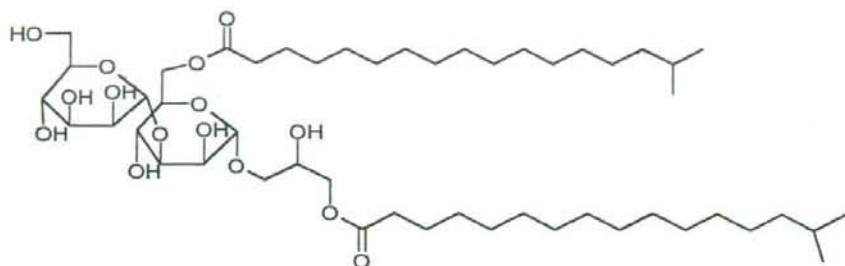


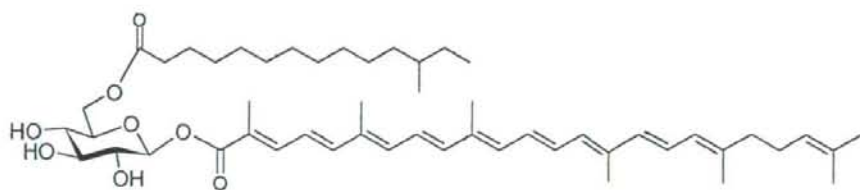
図1 異なる強さでのTCR刺激に応答したサイトカイン分泌。V $\alpha$ 19Tg+, B6,  $\beta$ 2m $^{-/-}$ -マウス肝臓単核球細胞を固相化したanti-CD3抗体で刺激した時のサイトカイン分泌を測定した。結果は $\beta$ 2m $^{-/-}$ -細胞との比で表した。



$\alpha$ -ManCer誘導體( $\alpha$ -ManCer4Ph) cholesteryl acyl mannoside: R=C<sub>14</sub>:0 (myristate)



*Saccharopolyspora rectivirgula* 由来  $\alpha$ -mannosyl糖脂質



*Staphylococcus aureus*が産生する  $\beta$ -Man 構造を有するStaphyloxanthin

図2 invariant V $\alpha$ 19-J $\alpha$ 33TCR発現細胞活性化能を検討した糖脂質

## 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

研究分担者 松本 満 徳島大学疾患酵素学研究所免疫病態研究部門（教授）

### 研究要旨

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。自己寛容成立機構における胸腺上皮細胞の役割を胸腺上皮細胞に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 欠損マウス (AIRE-KO) に加え新たに 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、胸腺上皮細胞の分化プログラムにおける AIRE の役割を解析した。その結果、AIRE は胸腺上皮細胞が最終分化段階に成熟するために必要な分化因子として作用していることが明らかになった。すなわち、AIRE は多様な自己抗原が発現できる最終分化段階にまで胸腺上皮細胞を分化させるために必要であり、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寄与することが示唆された。

### A. 研究目的

胸腺における自己反応性 T 細胞の除去 (negative selection) には胸腺髄質上皮細胞 (medullary thymic epithelial cell: mTEC) によって多様な組織特異的自己抗原 (tissue-specific antigen: TSA) が T 細胞に提示されなければならない。遺伝性自己免疫疾患の原因遺伝子 AIRE は mTEC に特異的に発現し、このプロセスに関わっていると考えられるが、そのメカニズムの詳細は不明である。AIRE による TSA の発現制御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 mTEC における多様な TSA 発現を AIRE 自身が転写レベルで直接制御しているという考え方であり、このモデルでは AIRE に mTEC に対する分化因子としての役割があるとは考えない (terminal differentiation model)。これに対してもう一つのモデルでは多様な TSA 発現の転写制御機構に AIRE は直接関与せず、AIRE の働きとは独立に mTEC の最終分化段階において獲得される多様な TSA 発現状態にまで AIRE が mTEC を分化させると考える (developmental model)。本研究ではこれら二つのモデルを検証し、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 欠損マウス (AIRE-KO) に加え、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) を新たに作製した。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 を採取し、mTEC が

発現する代表的な TSA である *insulin2* 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*)、あるいは AIRE-KO の胸腺組織標本を用いて AIRE 欠損に伴う AIRE 発現 mTEC と AIRE 非発現 mTEC の細胞構築化を評価した。terminal differentiation model が正しければ基本的に AIRE 欠損にともなう mTEC の細胞構築変化は認めないと考えられる。これに対し developmental model が正しければ、AIRE 欠損により mTEC の細胞構築は大きく変化することが予想される。

#### (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 では期待通り、AIRE 発現細胞が GFP によって標識された。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 陽性細胞が多数認められ、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 FACS sorting し、*insulin2* (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) の発現を定量 PCR 法により解析した。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。次いで、AIRE 発現 mTEC を抗 GFP 抗体を用いた免疫組織染色によって可視化したところ、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、髄質の中心に集中する傾向) を示した。また、最終分化段階の mTEC において観察される involucrin 発現を抗 involucrin 抗体を用いた免疫組織染色によって検討したところ、AIRE-KO および AIRE/GFP-KI (*gfp/gfp*) のいずれにおいても involucrin 陽性細胞の減少を認めた。さらに involucrin を強く発現する Hassall 小体の形成は、AIRE-KO および AIRE/GFP-KI (*gfp/gfp*) において欠失していた。このことから AIRE は AIRE 発現 mTEC の分化を制御しており、それによって胸腺の mTEC の細胞構築化に対して重要な役割をもつことが明確になった。

## D. 考察

私達の AIRE/GFP-KI を用いた解析結果は terminal differentiation model に矛盾しないものであったが、AIRE 欠損にともない mTEC の細胞構築化が大きく変化することが明らかになったことから developmental model の考え方がより正しいと結論付けた。しかしながら、ごく最近、AIRE が非メチル化ヒストン H3K4 に特異的に結合するという報告が相次いでなされ、多様な TSA 発現を AIRE 自身が転写レベルで直接制御している可能性が示唆されている。developmental model を支持する私達の結論と terminal differentiation model を支持するこうした報告を検証する上で、AIRE の標的遺伝子が一体何であるかを明らかにすることが必要不可欠である。

## E. 結論

AIRE は mTEC の分化因子としての役割をもち、それによって多様な TSA 発現を示す mTEC の最終分化段階への成熟化にはたらいているものと考えられた。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Yano, M., Kuroda, N., Han, H., Horike, M., Nishikawa,

Y., Kiyonari, H., Maemura, K., Yanagawa, Y., Obata, K., Takahashi, S., Ikawa, T., Satoh, R., Kawamoto, H., Mouri, Y., and Matsumoto, M.

Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance.

J. Exp. Med. 205: 2827-2838, 2008.

2) Akiyama, T., Shimo, Y., Yanai, H., Qin, J., Ohshima, D., Maruyama, Y., Asaumi, Y., Kitazawa, J., Takayanagi, H., Penninger, J.M., Matsumoto, M., Nitta, T., Takahama, Y., and Inoue, J-I.

The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance.

Immunity 29: 423-437, 2008.

3) Hikosaka, Y., Nitta, T., Ohigashi, I., Yano, K., Ishimaru, N., Hayashi, Y., Matsumoto, M., Matsuo, K., Penninger, J.M., Takayanagi, H., Yokota, Y., Yamada, H., Yoshikai, Y., Inoue, J-I., Akiyama, T., and Takahama, Y.

The cytokine RANKL produced by positively selected thymocytes fosters medullary thymic epithelial cells that express autoimmune regulator.

Immunity 29: 438-450, 2008.

4) Matsumoto, M., Zhou, Y., Matsuo, S., Nakanishi, H., Hirose, K., Oura, H., Arase, S., Ishida-Yamamoto, A., Bando, Y., Izumi, K., Kiyonari, H., Oshima, N., Nakayama, R., Matsushima, A., Hirota, F., Mouri, Y., Kuroda, N., Sano, S., and Chaplin, D.D.

Targeted deletion of the murine corneodesmosin gene delineates its essential role in skin and hair physiology.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 6720-6724, 2008.

## 2. 学会発表

1) Matsumoto, M., Sano, S., Ishida-Yamamoto, A., Zhou, Y., Matsuo, S., Nakanishi, H., Hirose, K., Oura, H., Arase, S., and Chaplin, D.D.

Targeted deletion of the murine *corneodesmosin* gene delineates its essential role in skin and hair physiology.

International Investigative Dermatology 2008, Kyoto, May 17, 2008.

2) Yano, M., Nishikawa, Y., Ikawa, T., Satoh, R., Kawamoto, H., Mouri, Y. and Matsumoto, M.

Aire controls the differentiation program of medullary thymic epithelial cells.

ThymUS

San Juan, Puerto Rico, November 10, 2008.

Abstract p43.

3) Matsumoto, M.

Aire-dependent organization of thymic microenvironment.

第 38 回日本免疫学会総会、京都、2008. 12. 2

日本免疫学会総会・学術集会記録第 38 巻, p8, 2008.

4) Masashi, Y., Mouri, Y., Nishikawa, Y., Ikawa, T., Satoh, R., Kawamoto, H., and Matsumoto, M.

Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance.

第 38 回日本免疫学会総会、京都、2008. 12. 3

日本免疫学会総会・学術集会記録第 38 巻, p235, 2008.



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

## 多発性硬化症の免疫制御機能の解析に関する研究

研究分担者 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

自己免疫調節（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、様々な自己蛋白の mTEC での発現と、それによる自己反応性 T 細胞の除去、すなわち中枢性免疫寛容の成立に、必須の遺伝子である。しかし、中枢神経系自己免疫疾患への AIRE の関与については、不明であった。そこで、本研究においては、代表的髄鞘抗原である、Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) および Proteolipid Protein (PLP) に対する自己免疫反応における AIRE の重要性を、AIRE ノックアウト (KO) マウスを用いた 2 つの実験系で検討した。一つは、髄鞘抗原を免疫する実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE)、もう一つは無免疫状態での髄鞘抗原に対する自己免疫反応である。AIRE KO マウスは、MOG の免疫寛容の成立には関与せず、PLP の胸腺内発現と免疫寛容の誘導を制御していることが判明した。さらに AIRE KO マウスでは、加齢とともに、無免疫でも髄鞘抗原に対する自己免疫応答が起きていることが示唆された。高齢の AIRE KO マウスは、中枢神経系髄鞘抗原に対する自然発症自己免疫反応のモデルとして、MAIT 細胞による MS 治療研究のための、ユニークな実験モデルとなると考えられる。

### A. 研究目的

多発性硬化症 (MS) は、中枢神経系に多発する炎症性脱髄性疾患であり、その炎症の本態は、髄鞘抗原特異的 T 細胞が介在する自己免疫疾患であると考えられている。発症の原因は不明であるが、動物実験の結果から、中枢性（胸腺内）あるいは末梢性の髄鞘抗原に対する免疫寛容の破綻が重要な役割を果たしていると考えられる。本研究の目的は、MAIT 細胞を介した MS 治療研究に適した、自己免疫性脳脊髄炎モデルの確立である。

自己免疫調節 (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 での発現と、それによる自己反応性 T 細胞の除去、すなわち中枢性免疫寛容の成立に、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、AIRE KO マウスは、中枢神経症状を発症しなかったため、中枢神経系自己免疫疾患への AIRE の関与は、詳細には検討されてこなかった。そこで、本研究においては、二つの代表的髄鞘抗原である、Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) および Proteolipid Protein (PLP) に対する自己免疫反応における AIRE の重要性を、AIRE KO マウスを用いた 2 つの実験系で検討した。一つは、髄鞘抗原を免疫する実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE)、もう一つは無免疫状態での自然発症自己免疫反応である。

### B. 研究方法

#### 1) 胸腺内髄鞘抗原の発現測定

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 により、MOG および PLP 遺伝子発現レベルを定量した。

#### 2) EAE の誘導

MOG および PLP 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

免疫後の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- $\gamma$ 、IL-17 濃度を ELISA 法により測定した。また、高齢マウスの脊髄浸潤細胞の刺激の場合は、無免疫の生後 6~8 ヶ月の高齢マウスから脊髄を取り出し、比重遠心分離法により、脊髄浸潤単核球を採取、ペプチドで再度刺激し、培養上清中の IFN- $\gamma$ 、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) 胸腺内髄鞘蛋白の AIRE による発現制御

野生型及び AIRE KO マウス胸腺 mTEC における髄鞘蛋白遺伝子発現を定量したところ、MOG は両ストレインで同等であったのに対し、PLP の発現量は、AIRE KO マウスで有意に減少していた。

### 2) 胸腺内髄鞘蛋白発現と EAE 病態の関連

野生型と AIRE KO マウスを種々の髄鞘蛋白で免疫して EAE を誘導したところ、mTEC での髄鞘蛋白の発現量と、EAE 重症度の間には相関があることが判明した。すなわち、MOG 免疫後の EAE は差がなかったのに対し、PLP 誘導後は、AIRE KO マウスで有意な重症化が認められた。

### 3) AIRE KO マウスにおける EAE 重症化機序の解析

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、MOG 免疫後の IL-17 と IFN- $\gamma$  産生量には両ストレイン間で差がなかったが、PLP 免疫後には AIRE KO マウスにおける両サイトカイン産生が有意に亢進していた。

### 4) 無免疫マウスにおける自己免疫反応の解析

脊髄浸潤細胞によるサイトカイン産生では、野生型は刺激後のサイトカイン産生がほとんど見られなかったのに対し、AIRE KO マウスでは、IFN $\gamma$ 、IL-17 とともに強い産生が認められた。

## D. 考察

AIRE KO マウスは、髄鞘抗原のうち、MOG の免疫寛容の成立には関与せず、PLP の胸腺内発現と免疫寛容の誘導を制御することが判明した。さらに AIRE KO マウスでは、加齢とともに、無免疫でも髄鞘抗原に対する自己免疫応答が起きていることが示唆された。

## E. 結論

高齢の AIRE KO マウスは、中枢神経系髄鞘抗原に対する自然発症自己免疫反応のモデルとして、MAIT 細胞による MS 治療研究のための、ユニークな動物実験モデルになると考えられる。

## 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. Aranami, T., and T. Yamamura. 2008. Th17 cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol. Int.* 57(2): 115-120.

3. 荒浪利昌、山村隆. 2008. ギランバレー症候群と細胞性免疫. *医学のあゆみ* 226(2): 152-155.

### 2. 学会発表

1. 田川朝子、荒浪利昌、山村隆. Autoimmune regulator (Aire) はミエリン抗原の胸腺内発現と EAE の発症を制御する. 第 20 回日本神経免疫学会学術集会. 新潟. 2008 年 4 月 17 日.
2. 荒浪利昌、佐藤和貴郎、山村隆. MS における  $\alpha$ B-crystallin 特異的 CD4 陽性 CD28 陰性 Th1 細胞の異常増殖とその分子機序. 第 20 回日本神経免疫学会学術集会. 新潟. 2008 年 4 月 18 日.
3. 佐藤和貴郎、荒浪利昌、山村隆. ヒト Th17 細胞のケモカイン受容体の解析. 第 20 回日本神経免疫学会学術集会. 新潟. 2008 年 4 月 18 日.
4. Toshimasa Aranami, Wakiro Sato and Takashi Yamamura. Abnormally Differentiated CD28null TIM-3- Th1 Cells Specifically Respond to  $\alpha$ B-Crystallin in Multiple Sclerosis. Annual Meeting of FOCIS. Boston, MA, USA. 2008 June 7.
5. Toshimasa Aranami, Wakiro Sato and Takashi Yamamura. ABNORMALLY DIFFERENTIATED CD28NULL TH1 CELLS SPECIFICALLY RESPOND TO ALPHAB-CRYSTALLIN IN MULTIPLE SCLEROSIS. 9<sup>th</sup> International Congress of Neuroimmunology. Fort Worth, TX, USA. 2008 OCT 27.
6. 佐藤和貴郎、荒浪利昌、山村隆. ヒト Th17 細胞のケモカイン受容体の解析. 第 36 回日本臨床免疫学会総会学術集会. 東京. 2008 年 10 月 18 日.
7. 荒浪利昌、佐藤和貴郎、山村隆. 多発性硬化症における熱ショック蛋白  $\alpha$ B-crystallin 特異的 CD28 陰性 T 細胞. 第 38 回日本免疫学会総会学術集会. 京都. 2008 年 12 月 1 日.
8. 佐藤和貴郎、荒浪利昌、山村隆. ケモカイン受容体の発現によって特徴づけられる二つのヒト Th17 細胞. 第 38 回日本免疫学会総会学術集会. 京都. 2008 年 12 月 3 日.
9. 田川朝子、荒浪利昌、山村隆. Aire-deficient mice develop spontaneous autoimmunity to the central

nervous system antigens. 第38回日本免疫学会総会  
学術集会, 京都, 2008年12月1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20年度

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	頁	出版年
Michio Shimamura	Activation of Invariant Val9-Ja33 TCR a-bearing Cells by Stimulation with certain a-mannosylated glycolipids	George Powell and Olivier McCabe	Glycobiology Research Trends	Nova Science Publishers, New York	in press	2009

研究成果の刊行に関する一覽表・平成20年度

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻	頁	出版年
Yokote, H., S. Miyake, J. L. Croxford, S. Okji, H. Mizusawa, and T. Yamamura	NKT cell-dependent amelioration of a mouse model of multiple sclerosis by altering gut flora.	Am. J. Pathol.	173	1714-1723	2008
山村 隆、横手裕明、三宅幸子	腸管免疫からみた自己免疫性脳炎の発症と制御	Neuroimmunology	16	171-176	2008
Shimamura, M., Y-Y. Huang, R. Migishima, M. Yokoyama, T. Saitoh, and T. Yamamura	Localization of NK1.1+ invariant Va19 TCR+ cells in the liver with potential to promptly respond to TCR stimulation.	Immunol. Lett.	121	38-44	2008
Doi, Y., S. Okji, T. Ozawa, H. Hohjoh, S. Miyake, and T. Yamamura	Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines.	Proc Natl Acad Sci U S A	105	8381-8386	2008
Yano M, Kuroda N, Han H, Meguro-Horike M, Nishikawa Y, Kiyonari H, Maemura K, Yanagawa Y, Obata K, Takahashi S, Ikawa T, Satoh R, Kawamoto H, Mouri Y, Matsumoto M	Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance.	J Exp Med.	205	2827-2838	2008
Satoh, J-i., T. Misawa, H. Tabunoki, and T. Yamamura	Molecular network analysis of T-cell transcriptome suggests aberrant regulation of gene expression by NF- $\kappa$ B as a biomarker for relapse of multiple sclerosis.	Dis Markers	25	27-35	2008
Satoh, J-i., S. Obayashi, T. Misawa, H. Tabunoki, T. Yamamura, K. Arima, and H. Konno	Neuromyelitis optica/Devic's disease: Gene expression profiling of brain lesions.	Neuropathology	28	561-576	2008
Aranami, T. and T. Yamamura	Th17 cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS).	Allergol. Int.	57	115-120	2008
Okamoto, T., M. Ogawa, Y. Lin, M. Murata, S. Miyake, and T. Yamamura	Treatment of Neuromyelitis Optica: Current Debate.	Therapeutic Advances in Neurological Disorders.	1	43-52	2008

Araki, M., S. Miyake, and T. Yamamura	Synthetic glycolipid ligands for human iNKT cells as potential therapeutic agents for immunotherapy.	Curr. Medicinal. Chem.	15	2337-2345	2008
Michio Shimamura, Yi-Ying Huang, Masumi Kobayashi and Hiroshi Goji	Altered production of immunoregulatory cytokines by invariant Va19 TCRbearing cells dependent on the duration and intensity of TCR engagement.	Int. Immunol	21	179-185	2009
島村道夫	Invariant V $\alpha$ 19 TCR発現細胞のサイトカイン分泌能と免疫系制御	臨床免疫・アレルギー科	49	371-376	2008
佐藤和貴郎、荒浪利昌、山村隆	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	89-94	2008
Christian Klemann, Benjamin JE Raveney, Shinji Oki and Takashi Yamamura	Retinoid signals and Th17-mediated pathology	日本臨床免疫学会誌	印刷中		



#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

*Immunopathology and Infectious Diseases*

## NKT Cell-Dependent Amelioration of a Mouse Model of Multiple Sclerosis by Altering Gut Flora

Hiroaki Yokote,\*<sup>†</sup> Sachiko Miyake,\*  
J. Ludovic Croxford,\* Shinji Oki,\*  
Hidehiro Mizusawa,<sup>†</sup> and Takashi Yamamura\*

From the Department of Immunology,\* National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo, and the Department of Neurology and Neurological Sciences,<sup>†</sup> Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Improved hygiene has been suggested to influence certain autoimmune disorders, such as multiple sclerosis. In this study, we addressed whether altering the composition of gut flora may affect susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model of MS. We administered a mixture of non-absorbing antibiotics, kanamycin, colistin, and vancomycin (KCV), orally to mice induced to develop EAE. The antibiotic treatment, beginning 1 week prior to sensitization, altered the composition of gut flora and, intriguingly, also ameliorated the development of EAE. While this result was associated with a reduced production of pro-inflammatory cytokines from the draining lymph node cells, a reduction of mesenteric Th17 cells was found to correlate with disease suppression. In addition, we found that  $\alpha 14$  invariant NKT (iNKT) cells were necessary for maintaining the mesenteric Th17 cells. The homologous effects of KCV treatment and iNKT cell depletion led us to speculate that KCV treatment may suppress EAE by altering the function of iNKT cells. Consistent with this hypothesis, KCV treatment did not suppress EAE that was induced in iNKT cell-deficient mice, although it was efficacious in mice that lacked  $\alpha 19$  mucosal-associated invariant T cells. Thus, gut flora may influence the development of EAE in a way that is dependent on iNKT cells, which has significant implications for the prevention and treatment of autoimmune diseases. (*Am J Pathol* 2008, 173:1714–1723; DOI: 10.2353/ajpath.2008.080622)

The immunopathology of autoimmune diseases is still poorly understood, although comprehensive and multidisciplinary approaches continue to give us new insight

into the mechanisms of disease. Previous studies have generally supported a pathogenic role of interferon (IFN) $\gamma$ -producing Th1 cells in autoimmune diseases such as multiple sclerosis (MS) that affect the central nervous system (CNS).<sup>1</sup> As Th1 cells are cross-regulated by Th2 cells producing interleukin (IL)-4, IL-5, and IL-13, the counterbalance between Th1 and Th2 cells has been posed as a key issue in understanding the pathogenesis of MS.<sup>2</sup> However, the traditional "Th1/Th2" paradigm is now facing a fundamental challenge since a third class of helper CD4<sup>+</sup> T cells, named Th17 cells, have been found to cause autoimmune inflammation.<sup>3–5</sup> Th17 cells are IL-23-dependent cells that are distinct from Th1 and Th2 cells in their ability to produce IL-17<sup>6–8</sup> and their use of the ROR $\gamma$ t transcription factor.<sup>9</sup> Although the relationship between Th17 cells and Th1 or Th2 cells remains to be fully characterized, Th17 cells are likely to exert a predominant pathogenic activity in various inflammatory conditions associated with autoimmunity or allergy either independently or collaboratively with Th1 cells.<sup>10</sup>

It is widely accepted that development of autoimmune disease is under control of both genetic and environmental factors. For example, recent whole genome analysis has revealed that several genes including human leukocyte antigen-DR are positively linked with the susceptibility to MS.<sup>11</sup> In contrast, most of our knowledge about environmental factors relies on epidemiological data. Results of migration studies, as well as the reported presence of clusters or outbreaks of MS, have illustrated potential environmental influences on MS, including infection, stress, sunlight exposure, and sex hormone.<sup>12–14</sup> While an altered intestinal microflora has been suggested to be an environmental risk factor for rheumatoid arthritis,<sup>15</sup> inflammatory bowel disease,<sup>16</sup> and human allergy and asthma,<sup>17</sup> the status of gut flora has rarely been evaluated as a potential risk factor for MS.

Supported by the Health and Labour Sciences Research Grants on Brain Science and on Intractable Diseases (Neuroimmunological Diseases) from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

Accepted for publication September 9, 2008.

Address reprint requests to Dr. Takashi Yamamura, Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan. E-mail: yamamura@ncnp.go.jp.

Recent studies have shown that animals bred in a germfree environment are characterized by having low densities of lymphoid cells in the gut mucosa, a reduced size of specialized follicle structures, and low concentrations of immunoglobulins in the peripheral blood.<sup>18-21</sup> It is also of note that the intestinal lamina propria (LP) has been identified as a site that is constitutively inhabited by Th17 cells.<sup>9</sup> Thus the dialogue between host and bacteria at the mucosal interface seems to be critical in the development of the competent immune system.

To explore a possible role of intestinal microflora in the development of autoimmune disease, we tested if oral administration of the mixture of non-absorbing antibiotics kanamycin, colistin, and vancomycin (KCV) could modify the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) induced in C57BL/6 (B6) mice sensitized against a myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) peptide of amino acids 35 to 55 [MOG (35-55)]. Here we report that continuous oral KCV treatment, starting one week before immunization, significantly suppressed the development of EAE along with altering gut flora. Suppression of EAE was accompanied by a reduced production of pro-inflammatory cytokines from the draining lymph nodes (dLNs) in response to MOG (35-55). While the antibiotic treatment suppressed MOG (35-55) reactive Th17 cells within the mesenteric lymph nodes (MLNs), it also reduced the total number of mesenteric Th17 cells in naïve mice. Furthermore, unexpectedly we found that the Th17 cells in the MLNs are greatly reduced in *Cd1<sup>-/-</sup>* mice or *Ja281<sup>-/-</sup>* mice, which lack invariant  $V\alpha 14$  natural killer T (iNKT) cells,<sup>22</sup> and that the KCV-induced reduction of the mesenteric Th17 cells was only marginal in the iNKT cell-deficient mice. As such, KCV treatment and iNKT cell deletion showed homologous effects on the mesenteric Th17 cells, which led us to speculate that gut flora may influence the development of CNS autoimmune disease in a way dependent of iNKT cells. Consistently, oral KCV treatment did not alter the development of EAE in iNKT cell-deficient mice. These results indicate that iNKT cells play a critical role in the dialogue between host and commensal flora.

## Materials and Methods

### Mice and Induction of EAE

Six-week-old female B6 mice were purchased from CLEA Laboratory Animal Corporation (Tokyo, Japan). *Mrl<sup>-/-</sup>* mice were provided by Dr. Susan Gillfillan, (Washington University School of Medicine, St. Louis)<sup>23</sup> and were backcrossed to B6 mice for ten generations.  $\beta 2$ -microglobulin<sup>-/-</sup> mice were purchased from Jackson Laboratories. *Cd1<sup>-/-</sup>*<sup>24</sup> and *Ja281<sup>-/-</sup>*<sup>25</sup> mice were provided by Dr. Steve B. Balk (Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA) and Dr. Masaru Taniguchi (Riken Research Center for allergy and Immunology, Yokohama, Japan) respectively. These mice were also back-crossed to B6 mice for ten generations. Animals were maintained in specific pathogen-free conditions in accordance with the institutional guidelines. For

induction of EAE, B6 mice were injected subcutaneously with 100  $\mu$ g MOG (35-55) (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) (TORAY Laboratory, Tokyo, Japan) and 1 mg heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco) emulsified in incomplete Freund's adjuvant. 200 ng of pertussis toxin (List Biological Laboratories) in 200  $\mu$ l PBS was injected i.p. on days 0 and 2 after immunization. Clinical symptoms of EAE were daily evaluated and scored as follows: 0, no clinical signs; 1, loss of tail tonicity; 2, impaired righting reflex; 3, partial hindlimb paralysis; 4, total hindlimb paralysis; 5, moribund or dead.

### Antibiotic Treatment of Mice

To treat mice with a mixture of non-absorbing antibiotics, we used a previously described protocol after adding minor modifications.<sup>26</sup> Briefly, to examine the effects of altering gut flora, a group of mice were given *ad libitum* access to drinking water supplemented with kanamycin (1 mg/ml), colistin (2000 U/ml), and vancomycin (0.1 mg/ml). Normal drinking water was given to another group of mice serving as control. For immunological studies of MLNs, LPLs, and splenocytes, the antibiotic-containing water was continuously given for 1 week until individual experiments were conducted. To evaluate the effect of antibiotics on EAE and recall responses, the treatment was started 1 week before immunization, and continued during the entire observation period.

### Cell Proliferation and Cytokine Analysis

To measure cell proliferation and cytokine production, we stimulated lymph node cells ( $1 \times 10^6$ /well) with anti-CD3 antibody (2C11) at 5  $\mu$ g/ml for 72 hours in 96-well round-bottomed plates. For evaluating MOG (35-55)-specific recall responses, we stimulated lymph node cells ( $1 \times 10^6$ /well) with MOG (35-55) peptide at 1 to 100  $\mu$ mol/L for 72 hours. The cells were suspended in RPMI 1640 medium (GIBCO) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mmol/L L-glutamine, 100 U/ml of penicillin-streptomycin, 2 mmol/L sodium pyruvate and 50 mmol/L  $\beta$ -mercaptoethanol. T cell proliferation to MOG (35-55) was determined by measuring the incorporation of [<sup>3</sup>H] thymidine (1  $\mu$ Ci/well) during the last 24 hours of culture in a  $\beta$ -1205 counter (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Assays were conducted in triplicate wells and data were expressed as counts per minute (c.p.m.). Culture supernatant was collected 72 hours after stimulation, and cytokines in the supernatant were measured by using cytometric bead array kits for mouse inflammatory cytokines (BD Biosciences) and IL-17 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D systems).

### Surface Marker Analysis, Quantification of CNS Leukocytes and Histology

Cells were stained with fluorescence-labeled specific antibodies after incubation with anti-CD16/32 to avoid non-specific staining and were analyzed with a FACSCalibur

(BD). Except for Foxp3-APC from eBioscience, all of the other antibodies were obtained from BD Pharmingen. For flow cytometric analysis of CNS-infiltrated cells, spinal cords were homogenized, passed through 70- $\mu$ m nylon mesh and separated by Percoll density-gradient centrifugation to obtain single-cell suspensions. In some experiments, paraffin-embedded spinal cords were stained with either luxol fast blue or H&E for conventional histological analysis.

### Intracellular Staining

Cells collected from MLN were stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (50 ng/ml) and ionomycin (750 ng/ml) for 5 hours in the presence of GolgiPlug (BD Biosciences). Cells were first stained extracellularly with PerCP-conjugated anti-CD4, APC-conjugated anti-T cell receptor- $\beta$  and  $\alpha$ -GalCer-loaded Dimer X recombinant soluble dimeric mouse CD1 days (BD Pharmingen), and then stained with fluorescein isothiocyanate-conjugated mAb A85-1 specific for mouse IgG1 (BD Pharmingen), and fixed and permeabilized with Fixation/Permeabilization solution (BD Biosciences). Finally, cells were stained intracellularly with phycoerythrin-conjugated anti-IL-17 (BD Biosciences). Samples were acquired on a FACSCalibur (BD Biosciences), and data were analyzed with CELLQuest software (BD Biosciences).

### Isolation of Lamina Propria Lymphocytes

Intestines were removed from euthanized mice and placed in ice-cold PBS containing 25 mmol/L HEPES. After removal of residual mesenteric fat tissue, Peyer's patches were carefully excised, and the intestine was opened longitudinally. The intestine was then thoroughly washed in ice-cold PBS and cut into 1.5-cm pieces. The pieces were incubated four times in 5 ml of 5 mmol/L EDTA, in 10% fetal calf serum/25 mmol/L HEPES/PBS for 15 minutes at 37°C with fast rotation (200 rpm). After each round of incubation, the epithelial cell layer, containing the intraepithelial lymphocytes, was removed. After the fourth EDTA incubation, the pieces were washed in PBS, and placed in 25 ml of RPMI containing 20% fetal calf serum, 25 mmol/L HEPES, and 300 U/ml of Collagenase H (Roche). Digestion was performed three times by incubating the pieces at 37°C for 40 minutes with slow rotation (100 rpm). The solution was then vortexed intensely and passed through a 70-mm cell strainer. The pieces were collected and placed into fresh digestion solution. The procedure was repeated three times. Supernatants from all three digestions from a single small intestine were combined, washed once in cold PBS, resuspended in 5 ml of the 40% fraction of a 40:80 Percoll gradient, and overlaid on 2 ml of the 80% fraction in a 15 ml Falcon tube. Percoll gradient separation was performed by centrifugation for 20 minutes at 2800 rpm at room temperature. LPLs were collected at the interphase of the Percoll gradient, washed once, and resuspended in FACS buffer or T cell medium. The cells were used immediately for experiments.

### RNA Extraction and Real-Time Reverse Transcription-PCR

The SV Total RNA isolation kit (Promega) was used for isolation of total RNA from mesenteric lymphocytes or splenocytes according to the manufacturer's instruction. First-strand cDNA was generated with the Advantage-RT kit (Clontech). The Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics) was used for quantitative PCR analysis. Gene expression values were normalized to expression of the hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (*Hprt*) as 'housekeeping' gene. QuantiTect Primer Assay (Qiagen) was used for amplification of IL-21 and IL-23. The other primers used were as follows: *HPRT* forward, 5'-GTTGGATACAGCCAGACTTTGTTG-3'; *HPRT* reverse, 5'-GAGGGTAGGCTGGCCTATAGGCT-3'; *ROR- $\gamma$*  forward, 5'-TGTCTGGGCTACCCTACTG-3'; *ROR- $\gamma$*  reverse, 5'-GTGCAGGAGTAGGCCACATT-3'; *TGF- $\beta$ 1* forward, 5'-TGCGCTTGCAGAGATTAATAA-3'; *TGF- $\beta$ 1* reverse, 5'-GCTGAATCGAAA GCOCTGTA-3'; *IL-6* forward, 5'-TTCCATCCAGTTGCCTTCTT-3'; *IL-6* reverse, 5'-CAGAATTGCCQATTGCCATTGCACAAC-3'.

### Statistics

EAE clinical severity was daily scored as mean  $\pm$  SEM for each group, and analyzed by the Mann-Whitney U non-parametric ranking test. Differences in cumulative scores of each group of mice were evaluated by Student's *t*-test. Cytokine secretion data were analyzed with Student's *t*-test.

### Results

#### Oral KCV Treatment Suppressed the Development of EAE and Inhibited Pro-Inflammatory Cytokine Production from Draining Lymph Node Cells

With an attempt to modulate the composition of intestinal flora, we treated wild-type B6 mice orally with a combination of antibiotics KCV as described in Materials and Methods. Because these antibiotics are not absorbed through gut mucosa,<sup>27</sup> any effect caused by this treatment is thought to arise from within the gut lumen. To examine whether our treatment protocol would change the composition of intestinal flora, we applied the DNA microarray system referred to as 'FloraArray'<sup>28</sup> and made a comprehensive analysis for intestinal flora derived from KCV-treated mice and control mice. To compare the signal intensities of intestinal flora from the two groups of mice, MA plots were illustrated from the fluorescent images. Although each spot on the FloraArray is derived from a number of different strains in the commensal microflora, this analysis gives us useful information regarding the composition of gut flora. The MA-plot analysis revealed that 722 out of 1536 spots showed more than twofold increase in the fecal DNA sample from KCV-treated mice as compared with those from control mice. By contrast, 894 spots showed more than twofold in-