

れるとされた。近年、NMOの病型を呈するなかに中枢神経、特にアストロサイトに高発現する水チャンネルである、アクアポリン4(AQP4)に対する自己抗体を有する者が存在することが明らかになった²⁾。抗AQP4抗体は特異性が高いため診断の有用なマーカーとなるが、必ずしも病勢を反映しておらず、またCMSとNMOを鑑別するには感度が十分でない(30~80%)。また、わが国におけるMSの寛解期治療にはIFN-βが用いられるが、抗AQP4抗体を有する病態では効果がないことが示唆され³⁾、CMSにおいてもIFN-βの効果があるものもないものがある。このように一言でMSといってもその病態は多種多様である。その臨床経過の把握、治療反応性の判定、予後予測といった質の高い患者管理のためには、適切なバイオマーカーが不可欠である。

MSの病態

疾患活動性バイオマーカーを考える上で、初めにMSの病態機構を簡単に紹介する(図)。MSの本態は中枢神経のミエリン蛋白に対する自己免疫反応であると考えられており、自己免疫反応にはCD4陽性ヘルパーT細胞が中心的な役割を果たし、自己反応性CD4陽性T細胞は中枢神経系に浸潤するとされてきた。自己反応性T細胞は末梢リンパ組織において活性化され、IFN-γ産生性Th1細胞やIL-17産生性Th17細胞へ分化する。これら活性化T細胞には、CXCR3、CCR2などのケモカイン受容体、およびVLA-4などの接着分子が発現している。

炎症細胞が中枢神経に浸潤するためには血液脳関門(BBB)を破壊する必要がある。BBBは血管内皮とglia limitansの2層構造からなるが、CXCR3リガンドであるIP-10などのケモカインや、VLA-4リガンドであるVCAM-1、osteopontinの発現が血管内皮細胞で増加しており、自己反応性T細胞は血管内皮に接着し、perivascular cuffに浸潤する。髄腔は概念としてperivascular cuffに相当する。そして、活性化マクロファージなどによって提示された髄鞘蛋白に特異的に反応、再度活性化し、IFN-γ、IL-17など様々な炎症性サイトカインやケモカインを産生しBBBを破壊する。これらの炎症反応や、BBBの破綻に伴い動員されたB細胞が産生する自己抗体が髄鞘を障害し、脱髄がおこる。抗AQP4抗体はglia limitans上のアストロサイト足突起に高発現しているAQP4を直接障害する可能性があり、BBBの破壊にも関わっていると考えられる。

これに対して、自己反応性T細胞や病的な免疫系の活性化に対して抑制的に働く免疫系細胞の存在が知られており、免疫調節細胞と呼ばれる。免疫調節細胞は、炎症性サイトカインに拮抗するIL-4、IL-10などの調節性サイトカインを産生し、自己反応性T細胞に対して抑制的に働く。MSにおいてはCD4陽性CD25陽性T細胞、NK細胞、NKT細胞などが免疫調節細胞として示唆されている。

疾患活動性バイオマーカー

ここではMSの病態に応じ、炎症の司令塔となる① T

カテゴリ	バイオマーカー	サンプル	疾患活動性増悪時	参考文献
Th1細胞関連	pSTAT1, T-bet	PBMC	頻度増加	J Neurosci Res. 2006; 84: 1027-36.
Th17細胞関連	IL-17	CSF	増加	Brain. 2005; 128: 988-1002.
アポトーシス	IAP	PBMC	発現増加	Mult Scler. 2008; 14: 577-94.
	osteopontin	CSF	増加	Arch Neurol. 2008; 65: 232-5.
ケモカインおよびケモカイン受容体	CXCR3, CCR5	CSF infiltrated T cells	増加	Mult Scler. 2003; 9: 189-98.
	CXCR3, IP-10	CSF infiltrated T cells	増加	J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2002; 72: 498-502.
	CCR2	CSF infiltrated T cells	増加	Biomark Insights. 2007; 2: 463-8.
接着分子	sICAM-1, sVCAM-1	CSF	濃度増加	J Neurol. 2005; 252: 146-50.
	sICAM-1, sVCAM-1	serum	濃度増加	J Neurol. 2005; 252: 526-33.
	MMP-9	serum, CSF	濃度増加	Mult Scler. 2006; 12: 294-301.
	MMP-3	serum	濃度増加	J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2006; 77: 185-9.
脱髄、軸索障害	neurofilament	CSF	増加	Mult Scler. 2010; 16: 287-92.
	GFAP, S100β	CSF	増加	J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2009; 80: 575-7.
NK細胞	CD11c	PBMC	発現増加	J Immunol. 2006; 177: 5659-67.

PBMC 末梢血単核球細胞, CSF 髄液, serum 血清

細胞, その中枢への移行に関わる ② ケモカイン, ③ 接着分子, その後におこる ④ 組織破壊と, 炎症の補助を行う ⑤ B 細胞, 炎症の制御を行う ⑥ 免疫調節細胞に分けて述べる. これまでに報告のあった, 主な MS の疾患活動性に関するバイオマーカーを表に列挙する.

1. Th1/Th17 細胞関連マーカー, 活性化マーカー

MS では CD4 陽性 T 細胞の活性化, 頻度の増加, アポトーシス異常などが認められる. これらは疾患活動性を反映する可能性が想定され, 末梢血および髄液中での動態が様々な角度から解析されてきた. 病原性 T 細胞としては Th1 細胞や Th17 細胞が想定されている. Th1 細胞分化には, STAT-1 や T-bet などの転写因子が重要な役割を果たすが, CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞に占める, 活性化型 STAT-1 および T-bet 陽性細胞の頻度が MS の再発時に増加すると報告されている. また, IFN- γ や IL-17 産生細胞の割合が MS の髄液中では増加しており, 再発時には IL-17 産生細胞がさらに増加するという報告がある⁴⁾. IL-17 は再発時に CMS より NMO の髄液中で上昇していると報告されており, Th17 細胞の NMO 病態へのより強い関与が予想される. これら病原性 T 細胞の鍵となる遺伝子発現やサイトカインは疾患活動性のバイオマーカーとして期待される.

また, 活性化 T 細胞のアポトーシス異常は, 自己免疫疾患発症の一因となることが示唆されている. そこで疾患活動性とアポトーシス関連蛋白の相関が解析されている. active MS においては, stable MS に比べて inhibitor of apoptosis (IAP) という, 抗アポトーシス蛋白ファミリーの発現上昇が認められた. この発現上昇は MRI での新規病巣数と相関した. また, MS の再発時に髄液中で上昇し, 病変部に発現が高まる osteopontin は, MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) において活性化 T 細胞の抗アポトーシス蛋白を亢進させ, 病態を増悪, 遷延させることが知られ, 活性化マーカーとして注目されている⁵⁾.

2. ケモカインとケモカイン受容体

ケモカインは細胞の遊走を誘導するサイトカインであり, MS の病態においても自己反応性 T 細胞およびその他の炎症性細胞の, 病巣への浸潤に重要な役割を果たすと考えられており, 疾患活動性マーカーとしての報告も多い.

再発時には, 主として Th1 細胞に発現される CXCR3, CCR5 といったケモカイン受容体陽性細胞の髄液中での頻度上昇や, 髄液中 IP-10 濃度の上昇が報告されている. EAE モデルにおいては Th17 に発現する CCR6 陽性細胞の脈絡叢を介しての髄腔内浸潤が炎症の惹起に必須であることが示されており, 注目されている⁶⁾. また CCR2 陽性 T 細胞の頻度上昇の報告もある. CCR2 は CCL2 (macrophage inflammatory protein-1, MCP-1) の受容体であり, 単球, マクロファージ系細胞に高レベルに発現し, これら自然免疫系の細胞を炎症巣に誘導する働きがある. われわれは CCR2 陽性 CCR5 陰性 T 細胞が Th17 細胞であることを報告しており⁷⁾, 再発時の Th1 細胞や Th17 細胞に発現するケモカイン受容体は, 疾患活動性バイオマーカーとしての可能性が示唆される.

3. 接着分子, メタロプロテイナーゼ

MS の再発に際して, soluble ICAM-1 (sICAM-1), soluble VCAM-1 (sVCAM-1), など可溶性接着分子の血清中の濃度上昇が認められ, 自己反応性 T 細胞活性化に伴い血清中に放出されると考えられた. 血清中 sICAM-1 は, ガドリニウム増強病巣の出現に先立って上昇すると報告されている. また, メタロプロテイナーゼは, 細胞外基質 (extracellular matrix) を溶解することにより, BBB の破壊, 炎症細胞の組織への浸潤などに重要な役割を果たすことが示唆されている. MS の再発時には, MMP-9 は血清および髄液中濃度が, MMP-3 は血清中濃度が上昇すると報告されている.

4. 組織障害関連マーカー

MS においては脱髄が第一義的な病態であるが, 疾患早期の段階から軸索障害もおこることが示されている. Neurofilament light protein は軸索での主要な細胞骨格蛋白であるが, MS における髄液中での上昇が認められ, 特に再発時に顕著に上昇し, また, 再発の頻度, 神経症状の重症度と相関すると報告されている. 抗 AQP4 抗体陽性の NMO においては疾患早期にアストロサイトの破壊がおこることが知られ, 構成蛋白の GFAP や S100B が髄液中で上昇することが報告されており, 病勢を反映することで疾患活動性マーカーとしても期待される.

5. B 細胞関連マーカー

MS の病態において, B 細胞は自己反応性 T 細胞とともに

に、病原性細胞として重要な役割を果たしていると考えられている。それは、B細胞を除去する抗CD20抗体がMSの再発抑制に効果を示したからである⁸⁾。B細胞はその抗原提示能ないし抗体産生を通じて病態への関与が考えられるが、その研究は十分進んでいない。CMSにおける髄液中のオリゴクローナルバンドの存在から、B細胞が髄液中でクローナルな増殖をしていることが予想される。MSの診断に有用だが、その病態への関与はいまだ不明である。NMOでは抗AQP4抗体の病原性が示唆されているが、その抗体価が病勢と相関するかは決着をみていない。この抗体はポリクローナルであること、末梢血で抗体価が高いことから、抗AQP4抗体産生B細胞の病態への関わりはCMSと異なる可能性がある。B細胞の動態は前述のTh1/Th17細胞関連マーカーと併せて、CMSとNMOそれぞれの病態に則した疾患活動性マーカーの確立のためにも、その解明が本邦において特に求められている。

6. 免疫調節細胞

われわれの研究室では、NK細胞がEAEの調節細胞であると報告しているが⁹⁾、MS患者末梢血においてその数が減少しているという報告がある¹⁰⁾。われわれは、MS寛解期においてNK細胞のCD11c発現量が有意に増加し、それが調節機能障害を反映し、再発率と相関することを報告している。NK細胞の減少や機能障害は疾患活動性マーカーとしての有用性が期待できると考えられる。他の免疫調節細胞としてCD4陽性CD25陽性抑制性T細胞、NKT細胞などがあり、MSではその調節機能が障害されていることが予想されるが確定的な報告はまだない。

治療反応性バイオマーカー

現在、MS寛解期の維持療法としてIFN- β 治療が認められている。IFN- β は病原性T細胞と考えられるTh1細胞分化やTh17細胞分化を抑制するなどの効果が知られているが、CMSの中でも治療前に血清IL-17F(IL-17ファミリーの一つ)高値の患者にはIFN- β の効果が期待できないとの報告がある¹¹⁾。また、NMOでは抗AQP4抗体を有する場合はIFN- β で増悪する場合があります、それぞれ治療導入の指標となる。

一旦治療を開始した後は、その中和抗体の産生が問題となる。Neopterin、 β 2ミクログロブリン、myxovirus-

resistant protein A (MxA)などがバイオマーカーとして知られ、特にMxAのメッセンジャーRNA量は中和抗体の存在と新たな再発のリスクと相関しており、治療導入後のモニタリングに有用なバイオマーカーである¹²⁾。

今後、MSの治療としてGlatiramer acetate, Natalizumab (抗VLA4抗体), Rituximab (抗CD20抗体), FTY 720などが日本でも導入されてくると考えられるので、その治療反応性に関するバイオマーカーにも注目してゆく必要がある。

むすび

本邦におけるMSは増加傾向にあり、その病態は多種多様であると考えられる。本邦のMSには前述のような特徴があり、日本のMSの病態解明が、疾患コントロールに有用なバイオマーカーの確立に寄与すると考えられ、さらなる研究が求められている。

文 献

- 1) Okinaka S, Tsubaki T, Kuroiwa Y, et al. Multiple sclerosis and allied diseases in Japan ; clinical characteristics. *Neurology*. 1958 ; 8 : 756-63.
- 2) Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica : distinction from multiple sclerosis. *Lancet*. 2004 ; 364 : 2106-12.
- 3) 多発性硬化症治療ガイドライン委員会. 多発性硬化症治療ガイドライン 2010. 日本神経学会 ; 2010. <http://www.neuroimmunology.jp/MSgaido2009.pdf>
- 4) Brucklacher-Waldert V, Stuermer K, Kolster M, et al. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain*. 2009 ; 132 : 3329-41.
- 5) Hur EM, Youssef S, Haws ME, et al. Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells. *Nat Immunol*. 2007 ; 8 : 74-83.
- 6) Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol*. 2009 ; 10 : 514-23.
- 7) Sato W, Aranami T, Yamamura T. Cutting edge : human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5- phenotype. *J Immunol*. 2007 ; 178 : 7525-9.
- 8) Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2008 ; 358 : 676-88.
- 9) Zhang B, Yamamura T, Kondo T, et al. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J Exp Med*. 1997 ; 186 : 1677-87.
- 10) De Jager PL, Rossin E, Pyne S, et al. Cytometric profiling in multiple sclerosis uncovers patient population structure and a reduction of CD8 low cells. *Brain*. 2008 ; 131 : 1701-11.
- 11) Axtell RC, de Jong BA, Boniface K, et al. T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon- β in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med*. 2010 ; 16 : 406-12.
- 12) Polman CH, Bertolotto A, Deisenhammer F, et al. Recommendations for clinical use of data on neutralising antibodies to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2010 ; 9 : 740-50.

核内受容体を標的とした Th17 細胞制御と
自己免疫疾患

はじめに

多発性硬化症 (multiple sclerosis ; 以下 MS) は, 中枢神

みにれびゆう

経系の脱髄を主徴とし、Th1細胞やTh17細胞などのエフェクターT細胞の機能亢進による組織障害が病態形成に深く関わる典型的な炎症性自己免疫疾患である^{1,2)}。したがって病原性T細胞制御の観点からMSの病態を理解することは、本疾患の予防や治療への根本的な道を開くことにつながると考えられる。このような観点から、我々はMSの新規治療標的の同定を目的として、MS患者末梢血T細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、健常者に比較してMS患者T細胞で発現が変動する一連の遺伝子群の同定に成功した³⁾。そのなかで、MS患者で最も高い有意差をもって発現亢進を認めた遺伝子として同定したオーファン核内受容体NR4A2は、MSの動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis: 以下EAE) マウス由来の中枢神経浸潤T細胞でも発現の亢進が認められた。さらにT細胞のNR4A2発現レベルに相関して炎症性サイトカインの産生が変動し、一方NR4A2特異的siRNA処理によりpassive EAEモデルにおけるEAE病態が有意に抑制されたことから、NR4A2が病原性T細胞の機能亢進と病態形成に深く関わる可能性が示された⁴⁾。本稿では、自己免疫病態形成に関わるT細胞の炎症性サイトカイン産生におけるNR4A2の機能について、これまでに我々が明らかにした知見を中心に紹介する。

1. オーファン核内受容体 NR4A2

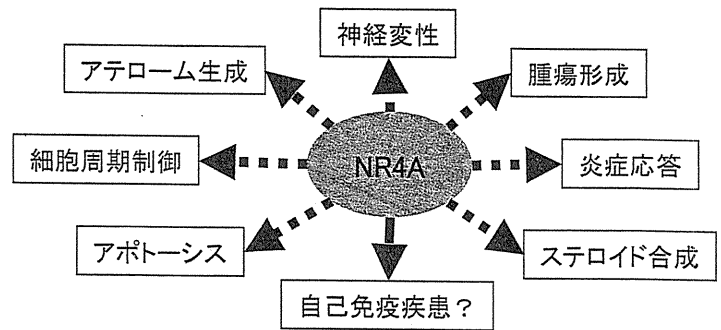
ヒトの核内受容体は48種類の異なる分子からなるファミリーをなしており、エストロゲン受容体、グルココルチコイド受容体や脂溶性ビタミン受容体などを含む^{5,6)}。病原性T細胞を構成するTh17細胞と核内受容体の関わりを考えた時、東の横綱はTh17細胞のマスター制御分子レチノイドオーファン受容体ROR γ /NR1F3⁷⁾で、西の横綱がリガンド依存性にTh17細胞機能抑制能をもつレチノイン酸受容体RAR α /NR1B1⁸⁾といったところであり、Th17細胞と核内受容体との関わりは予想以上に深いことを再認識させられる。さてNR4Aファミリー分子はNR4A1 (NGFB-I/Nur77), NR4A2 (Nurr1), NR4A3 (NOR1) の3種からなる⁹⁾。NR4Aファミリー分子は図1に示すような様々な生体応答に関与し、その一部には分子間の機能的オーバーラップが認められる。このなかでNR4A2の発現部位は主に中枢神経系に集中しており、なかでも中脳腹側、脳幹や脊髄に強い発現を認める。免疫学との関連では、T細胞受容体の架橋や炎症性サイトカインなどの刺激により、T細胞で一過性に発現誘導される immediate early gene として知られている。NR4Aファミリー分子は、核内受容体分子

間に共通の複数の機能ドメインからなる (図1)。このうち二つのZnフィンガーからなるN末側のDNA結合ドメイン (DBD) は、受容体間で非常に良く保存されており、標的分子プロモーター内の応答配列への結合に関わる。C末側に位置するリガンド結合ドメイン (LBD) は、各分子間での多様性が高く、通常それぞれ異なるリガンドを認識する。リガンドが結合した核内受容体ではAF2ドメインのコンフォメーションが変化し、末端のヘリックス12が活性型の配向をとると、コリプレッサーを遊離してコアクチベーターと会合するようになり転写活性化能を獲得する。一方、リガンドが未知の核内受容体はオーファン受容体と呼ばれ、NR4Aファミリー分子もこの中に含まれる。構造解析の結果、NR4A2のLBDはかさ高い芳香環や疎水性の側鎖をもつアミノ酸に覆われており、典型的なリガンド結合ポケットがないことが示されている¹⁰⁾。NR4A2のヘリックス12は、リガンド非依存的に活性型受容体類似のコンフォメーションをとることが分かり、現在ではリガンド非依存的に転写活性化能を有するものと考えられている。

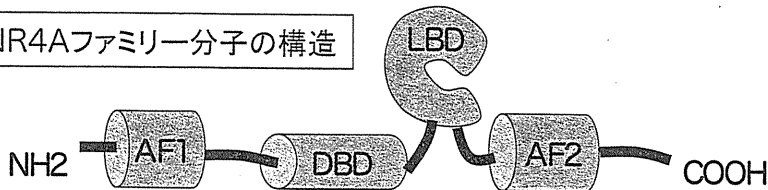
2. NR4A2の誘導因子と標的分子⁹⁾

NR4A2は、脂肪酸、プロスタグランジン、カルシウム、増殖因子、ペプチドホルモン、神経伝達分子など、実に様々な因子に応答して急速に発現が誘導される。これらの刺激で活性化されたNF- κ BあるいはCREBがプロモーターの転写活性化領域に結合することで、NR4A2遺伝子が発現されると考えられている。一方、NR4A2タンパク質はリガンド非依存的に認識配列に結合し、下流の遺伝子発現を誘導する (図2)。このようにNR4A2分子の機能制御は、主に誘導因子による転写誘導レベルで行われている。NR4Aファミリー分子の認識配列としては、①(A/T)AAAGGTC A配列からなるNBRE (NGFI-B response element; 単量体あるいは二量体のNR4A分子が結合)、②NBRE類似のAAAT (G/A) (C/T) CAの逆向き繰り返し配列からなるNurRE (Nur-responsive element; プロオピオメラノコルチン (POMC) プロモーターに存在)、③DR5配列 (レチノイドX受容体 (RXR) とのヘテロダイマー形成による) の3種が知られている。NR4A2の標的遺伝子として最も良く解析されている遺伝子の一つがチロシンヒドロキシラーゼ (TH) 遺伝子であり、NR4A2依存的なドパミン (DA) の産生は、TH遺伝子プロモーターに存在するNBREを介して誘導される。NR4A2を欠くマウスでは中脳黒質のドパミン産生ニューロンの形成が障害さ

分類名	別名
NR4A1	NGFI-B, Nur77
NR4A2	Nurr1, NOT, RNRI
NR4A3	NOR1, MINOR



NR4Aファミリー分子の構造



AF1/2; activation function 1, 2
DBD; DNA binding domain
LBD; ligand binding domain

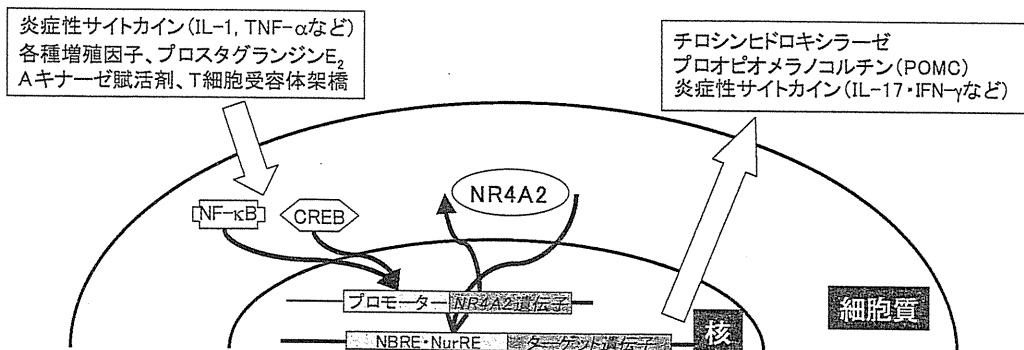


図1 NR4A核内受容体ファミリー分子

NR4Aファミリー分子は3種の分子からなり、核内受容体分子に共通の構造を有する。生理的なりガンドは不明であるが、さまざまな生体応答に関わる。NR4A2は、プロスタグランジン、増殖因子、炎症性サイトカインやT細胞受容体架橋に反応して発現が誘導され、これはNF-κBあるいはCREBの活性化を介すると考えられている。一方、このようにして発現したNR4A2分子は、NBRE (NGFI-B response element), NurRE (Nur-responsive element), DR5などの特定の配列を認識してターゲット遺伝子の発現を誘導する。これまでにチロシンヒドロキシラーゼを筆頭に、複数のターゲット遺伝子が報告されている。

れ¹¹⁾、さらに家族性パーキンソン病の一部にNR4A2の遺伝子異常が見いだされたことから¹²⁾、TH発現におけるNR4A2の重要性が再認識されている。他にもNR4A2の標的探索を目指した個別の解析から複数の標的遺伝子が報告されており、NR4A2は中枢神経機能制御のみならず、さまざまな領域に深く関わる可能性が示されている。

3. T細胞機能とNR4Aファミリー分子

免疫系におけるNR4Aファミリー分子の機能に関しては、T細胞アポトーシス誘導、および胸腺での「負の選択」におけるNR4A1分子の機能がとくに詳細に解析されてい

る^{13~16)}。TCR刺激によるカルシウム流入に伴って活性化したMEF2は、NR4A1発現を介してT細胞アポトーシスを引き起こす。一方で、この経路はNR4A1分子とBcl2分子との分子間相互作用を介した制御を受ける。つまりMEF2と結合した転写抑制因子Cabin1は、MEF2とp300の結合を阻害するとともに、mSin3との結合を介してHDAC1/2をリクルートすることにより、MEF2によるNR4A1の誘導経路を遮断してアポトーシスを抑制すると考えられている(挿絵参照)¹⁷⁾。一方、NR4A1欠損マウスの胸腺および末梢のT細胞アポトーシスには大きな異常はなく、胸腺などで共発現するNR4A2などの他の分子がNR4A1欠損

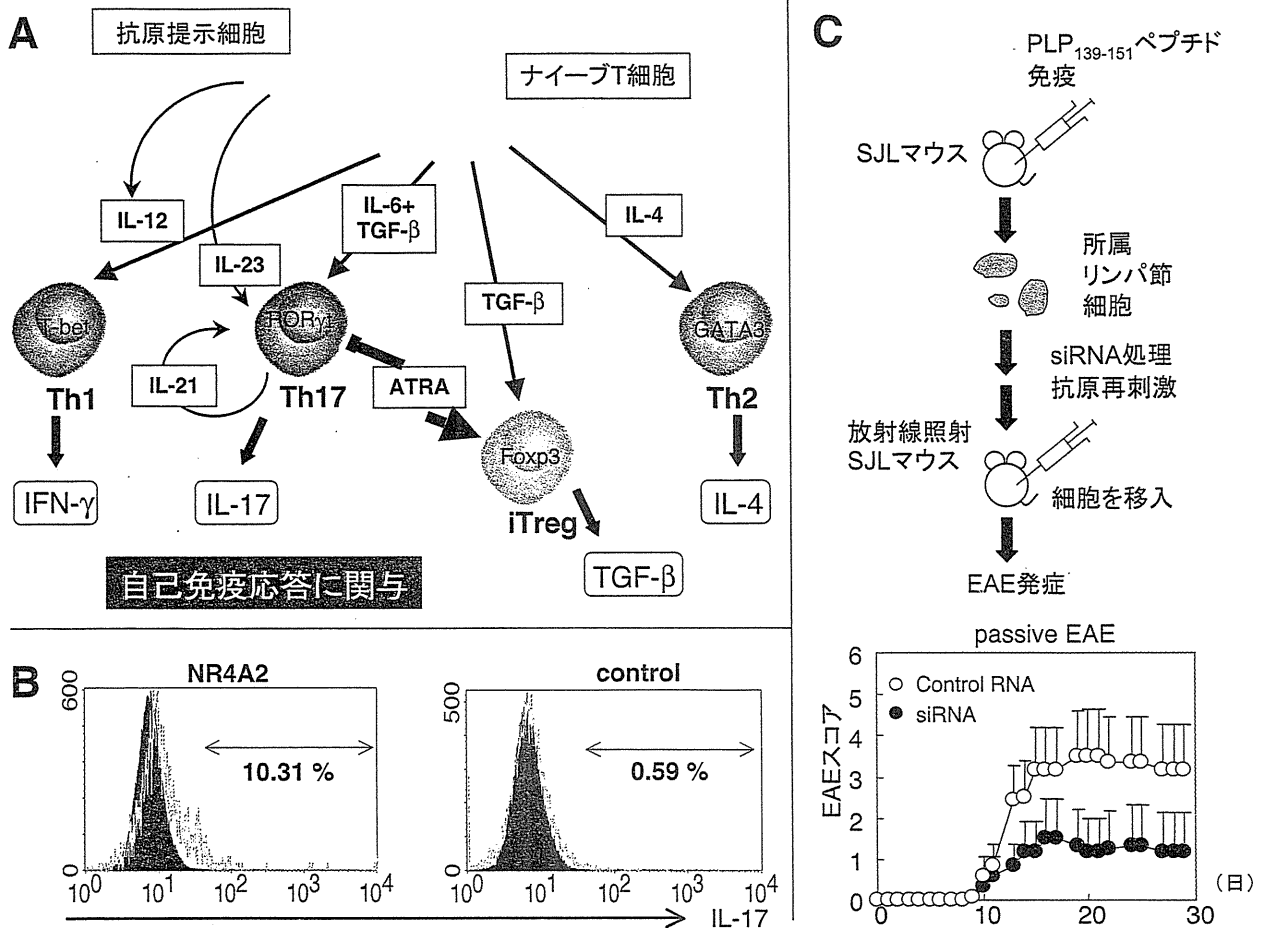


図2 自己免疫応答と Th17 細胞機能に対する NR4A2 の役割

(A) ナイーブ T 細胞が抗原提示細胞上の抗原を認識すると、種々のサイトカイン環境依存性にそれぞれ機能的に異なる T 細胞 (Th1/Th2/Th17/iTreg) へと分化する。自己免疫の観点からは、Th1 細胞と Th17 細胞の双方が自己免疫病態に関与すると考えられており、双方の細胞機能を制御することが重要な課題である。

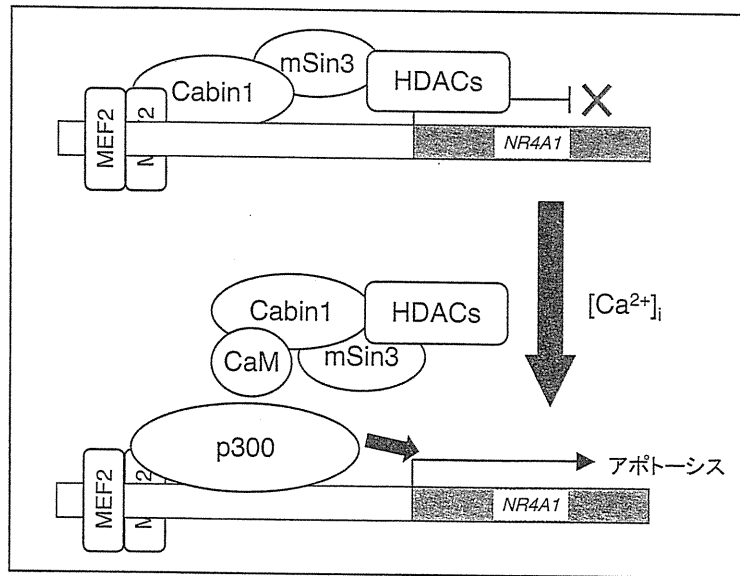
(B) NR4A2 遺伝子を IRES-GFP の上流に組み込んだレトロウイルスとコントロールウイルスを、それぞれマウス脾臓 CD4 陽性 T 細胞に感染させ、GFP 陽性細胞の炎症性サイトカイン産生を、細胞内サイトカイン染色法を用いて比較した。NR4A2 発現細胞 (GFP 陽性細胞) では、対照に比べて IL-17 の産生が増強している (0.59% vs 10.31%)。

(C) PLP₁₃₉₋₁₅₁ ペプチドを免疫した SJL マウスの所属リンパ節細胞に、NR4A2 特異的 siRNA あるいはコントロール RNA を遺伝子導入した。抗原ペプチド存在下で 3 日間培養して再刺激した細胞を、放射線照射した SJL マウスに移入し、EAE を誘導した。NR4A2 特異的 siRNA 処理群の EAE スコアは、コントロール群に比べて病態の軽症化が認められた。

を補完することにより、強い表現型の発現を抑制しているものと予想される。一方、NR4A2 欠損マウスでは、中脳のドパミン産生ニューロンの欠損が著しく、胎児は生後すぐに死亡する。この NR4A2 欠損マウスの表現型は NR4A1 や NR4A3 では補完できないことから、NR4A2 独自のユニークな機能の存在を強く示唆している。NR4A2 欠損マウスは、生後の長期維持が不可能なため、免疫系を含む体の機能異常の解析は難しく、コンディショナル欠損マウスなどを用いた解析が待たれる。

4. 自己免疫疾患における NR4A2 の役割

MS などの自己免疫疾患では、炎症性 T 細胞が脳炎惹起に重要な役割を果たす。エフェクター CD4 陽性 T 細胞は、複数の機能的に異なる細胞群に分類されるが、以前より知られていた Th1 細胞、Th2 細胞に加えて、Th17 細胞¹⁸⁾と制御性 T 細胞¹⁹⁾の発見を契機に、より複雑さを増している (図2)。MS の病態形成初期には、Th1 細胞や Th17 細胞に代表される自己反応性 T 細胞が決定的な役割を果たすと



(文献 17 より改変)

考えられており、このような病原性 T 細胞の遺伝子発現解析は、新規治療標的の探索に有効な手段である。我々は、DNA マイクロアレイを用いた MS 患者末梢血 T 細胞の網羅的遺伝子発現解析を通じて、MS 由来 T 細胞で発現が変動している遺伝子群を解析し、NR4A2 を含む興味深い遺伝子群を同定した³⁾。エフェクター T 細胞における NR4A2 の機能をより詳細に探るため、以後 MS のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（以下 EAE）における NR4A2 の挙動を追うこととした⁴⁾。

EAE は、中枢神経系に発現するミエリン・オリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG) やプロテオリピッドタンパク質 (PLP)、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) などに由来する脳炎惹起性ペプチドをマウスに免疫することで発症が誘導できる。MOG₃₅₋₅₅ ペプチドを免疫することにより EAE を発症した C57BL/6 マウスから T 細胞を分離し、NR4A2 の発現レベルを定量 PCR 法により比較したところ、中枢神経系浸潤 T 細胞および末梢血 T 細胞で、選択的な NR4A2 の発現亢進が検出された。中枢神経系浸潤 T 細胞のなかの約 3 割が IL-17 産生細胞であったことから、NR4A2 と IL-17 産生との間に何らかの関連がある可能性を予想してさらに検討を加えた。まず NR4A2 の発現亢進が、T 細胞の炎症性サイトカイン産生に与える影響を調べるため、IL-17 遺伝子プロモーターを含むレポーター遺伝子をマウス T 細胞株である EL4 細胞に導入してルシフェラーゼアッセイを試みたところ、NR4A の共発現によりルシフェラーゼ活性が有意に増強した。さらにレトロウ

イルスを用いて、脾臓 T 細胞に NR4A2 分子を過剰発現させると、TCR 刺激後の IL-17 産生が選択的に亢進した (図 2)。次にあらたに設計した NR4A2 特異的 siRNA を用いて、ヒト T 細胞の炎症性サイトカイン産生に与える影響を検討した。健康人由来末梢血 CD4 陽性 T 細胞を siRNA 処理した後抗 CD3 抗体で活性化して炎症性サイトカイン産生を調べた結果、NR4A2 特異的 siRNA 処理した T 細胞における IL-17 産生は有意に抑制された。本 siRNA は、MS 患者由来末梢血 CD4 陽性 T 細胞の炎症性サイトカイン産生に対しても抑制的に作用することが明らかとなった。一連の結果から、T 細胞における NR4A2 発現量と炎症性サイトカインの産生に正の相関があることが示された。本 siRNA の配列は、ヒト・マウス間で完全に保存されていたことから、EAE マウスにおける病原性 T 細胞の機能に対する siRNA の効果を検討した。PLP₁₃₉₋₁₅₁ ペプチドを SJL マウスに免疫して得られた抗原特異的 T 細胞を、放射線照射により T 細胞を除去した SJL マウスに移入する passive EAE モデルにおいて、*in vitro* で抗原刺激した T 細胞を NR4A2 特異的 siRNA で処理すると、移入後の EAE は有意に軽症化した (図 2C)。これらの結果は、NR4A2 が病原性に深く関わる Th17 細胞機能と関連していることを示しており、NR4A2 の発現あるいは機能制御を介して自己免疫病態が制御できるのではないかと考えている。

5. 自己免疫疾患治療標的としての核内受容体

核内受容体の約半数はいまだリガンドが未知のオーファン受容体であり、個々の機能は、その多くが不明のままである。一連の結果は、NR4A2がMS治療標的候補であることを示しているが、有効なリガンド化合物の創製なしには、さらなる臨床応用研究への展開は難しい。PPARなどの核内受容体においては、代謝制御因子としての生理機能が次々と明らかとなったことを皮切りに、高脂血症改善作用を有するフィブラート系PPAR- α 作動薬や、糖尿病治療作用を有するチアゾリジン系PPAR- γ 作動薬などの臨床応用が実現しており、核内受容体の新規リガンドの探索は創薬の観点からも非常に重要な研究領域であるといえる。免疫系、特にTh17細胞の制御に限ってみても、例えば天然型レチノイン酸および合成RARアゴニストが、Th17細胞分化の抑制と制御性T細胞の誘導を介して効果的に自己免疫応答を抑制することなどが明らかとなっており^{8,20)}、新規自己免疫疾患治療法としての合成RARアゴニストも注目を集めている。病原性T細胞と炎症性サイトカインの制御法の確立は、MSに限らず幅広い自己免疫疾患への展開が期待できるため、今後、NR4A2を標的とした治療戦略の実現に向けて研究を進めていく予定である。

おわりに

MSの病態解明を目的とした研究の過程で我々が新たに発見したオーファン核内受容体NR4A2の、免疫系とくに活性化T細胞の炎症性サイトカイン産生における機能と役割を中心に紹介した。本文でも述べたように、Th17細胞には様々な核内受容体の関与が示されているが、これは他のエフェクターT細胞との際だった違いであり、複数の核内受容体が複雑に関わり合いながらTh17細胞を制御していると思われる。特にTh17細胞機能に対するNR4A2の作用は全くといっていいほど分かっておらず、その分子機構を明らかにすることが急務であると思われる。

- 1) Aranami, T. & Yamamura, T. (2008) *Allergol. Int.*, 57, 115-120.
- 2) McFarland, H.F. & Martin, R. (2007) *Nat. Immunol.*, 8, 913-919.
- 3) Satoh, J., Nakanishi, M., Koike, F., Miyake, S., Yamamoto, T., Kawai, M., Kikuchi, S., Nomura, K., Yokoyama, K., Ota, K., Kanda, T., Fukazawa, T., & Yamamura, T. (2005) *Neurobiol. Dis.*, 18, 537-550.
- 4) Doi, Y., Oki, S., Ozawa, T., Hohjoh, H., Miyake, S., & Yama-

- mura, T. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 105, 8381-8386. Epub 2008 Jun 8311.
- 5) A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. (1999) *Cell*, 97, 161-163.
- 6) Robinson-Rechavi, M., Escriva Garcia, H., & Laudet, V. (2003) *J. Cell Sci.*, 116, 585-586.
- 7) Ivanov, I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D.J., & Littman, D.R. (2006) *Cell*, 126, 1121-1133.
- 8) Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., & Cheroutre, H. (2007) *Science*, 317, 256-260. Epub 2007 Jun 2014.
- 9) Maxwell, M.A. & Muscat, G.E. (2006) *Nucl. Recept. Signal.*, 4, e002. Epub 2006 Feb 2008.
- 10) Wang, Z., Benoit, G., Liu, J., Prasad, S., Aarnisalo, P., Liu, X., Xu, H., Walker, N.P., & Perlmann, T. (2003) *Nature*, 423, 555-560.
- 11) Zetterstrom, R.H., Solomin, L., Jansson, L., Hoffer, B.J., Olson, L., & Perlmann, T. (1997) *Science*, 276, 248-250.
- 12) Le, W.D., Xu, P., Jankovic, J., Jiang, H., Appel, S.H., Smith, R.G., & Vassilatis, D.K. (2003) *Nat. Genet.*, 33, 85-89. Epub 2002 Dec 2023.
- 13) Calnan, B.J., Szychowski, S., Chan, F.K., Cado, D., & Winoto, A. (1995) *Immunity*, 3, 273-282.
- 14) Cheng, L.E., Chan, F.K., Cado, D., & Winoto, A. (1997) *Embo J.*, 16, 1865-1875.
- 15) Liu, Z.G., Smith, S.W., McLaughlin, K.A., Schwartz, L.M., & Osborne, B.A. (1994) *Nature*, 367, 281-284.
- 16) Woronicz, J.D., Calnan, B., Ngo, V., & Winoto, A. (1994) *Nature*, 367, 277-281.
- 17) Youn, H.D. & Liu, J.O. (2000) *Immunity*, 13, 85-94.
- 18) Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K. (2009) *Annu. Rev. Immunol.*, 8, 8.
- 19) Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., & Ono, M. (2008) *Cell*, 133, 775-787.
- 20) Klemann, C., Raveney, B.J.E., Klemann, A.K., Ozawa, T., von Hörsten, S., Shudo, K., Oki, S., & Yamamura, T. (2009) *Am. J. Pathol.*, 174, 2234.

大木 伸司

((独)国立精神・神経医療研究センター 神経研究所
免疫研究部)

Manipulation of Th17-mediated autoimmunity by targeting nuclear receptors
Shinji Oki (Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan)

多発性硬化症の病態解析から 新規治療法の開発へ

大木伸司

Shinji OKI

(独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部

1 はじめに

多発性硬化症(multiple sclerosis ; MS)は、中枢神経系の脱髄を主因とする炎症性自己免疫疾患であり、エフェクターT細胞の自己応答性獲得による軸索の組織障害と、これに伴う電導障害が病態に深く関わっている。^{1,2)} よって免疫制御破綻の観点からMSの病態を理解することは、本疾患の予防や治療への根本的な道を開くと期待される。現在用いられているMS治療薬には、インターフェロン・ベータ(IFN- β)、抗炎症性ステロイドや免疫抑制剤などがあり、いずれもある程度の効果は得られているものの対症療法的な色合いも濃く、その作用機序の多くは不明なままである。

一方、我が国において治験の途上にある薬剤として、ペプチド製剤コパキソン(glatiramer acetate)、抗VLA-4抗体製剤タイサブリ、スフィンゴシン1リン酸受容体作動薬FTY 720(fingolimod)などがある。コパキソンは4種のアミノ酸からなるランダムコポリマー*で、いわゆる改変ペプチド抗原(altered peptide ligand ; APL)のように、抗原特異的なT細胞応答の修飾効果を狙っている。また、タイサブリは病原性リンパ球と血管内皮細胞とのVLA-4を介した接着を抑えることで、FTY 720は二次リンパ組織からの病原性リンパ球の流出を抑えることで、中枢神経系への炎症細胞浸潤を抑制する効果が期待されている。これらの薬剤は、近年の基礎免疫学の進歩により得られた、科学的な根拠に基づく次世代のMS治療薬候補といえる。このように、病原性リ

ンパ球の機能制御を標的とした新規MS治療法の探索は有望な研究対象であり、本稿では私たちが進めてきた代表的な試みを、以下に紹介する。

2 エフェクターT細胞の分化と自己免疫疾患

自己抗原反応性を獲得した炎症性エフェクターT細胞が中枢神経系に浸潤し、これを障害することでMS病態が形成される。これまで、ナイーブT細胞から抗原依存性に分化したエフェクターT細胞には、主にIFN- γ を産生するTh1細胞とIL-4を産生するTh2細胞があり、Th1細胞は自己免疫病態に促進的に作用する一方、Th2細胞は病態抑制に関わると言われてきた。ところが近年の研究の進展により、炎症性サイトカインであるIL-17を産生するTh17細胞と、各エフェクターT細胞の機能を抑制する制御性T細胞が発見され、^{3,4)} 実はTh17細胞がTh1細胞をしのご強力な病原性T細胞であることが明らかとなった(図1)。よって最近では、このTh17細胞の機能制御が有効な自己免疫疾患制御法につながると期待されており、大いに注目を集めている。以下に紹介する私たちの研究は、具体的な方法こそ違うが、いずれもこのような発想に基づいて展開されている。

1. iNKT細胞を標的としたMS治療戦略

iNKT(invariant natural killer T)細胞は、NK細胞とT細胞の表現型を共有する極めてユニークな細胞であり、活性化するとIFN- γ やIL-4などのサイトカインを短時間に大量に産生するため、体内の免疫応答バランスの調節細胞と考えられている。⁵⁾ また、多様性に富むT細胞受容体(TCR)を発現する通常のT細胞と異なり、iNKT細胞のTCRは

* ランダムコポリマーについての用語解説は、781頁参照。

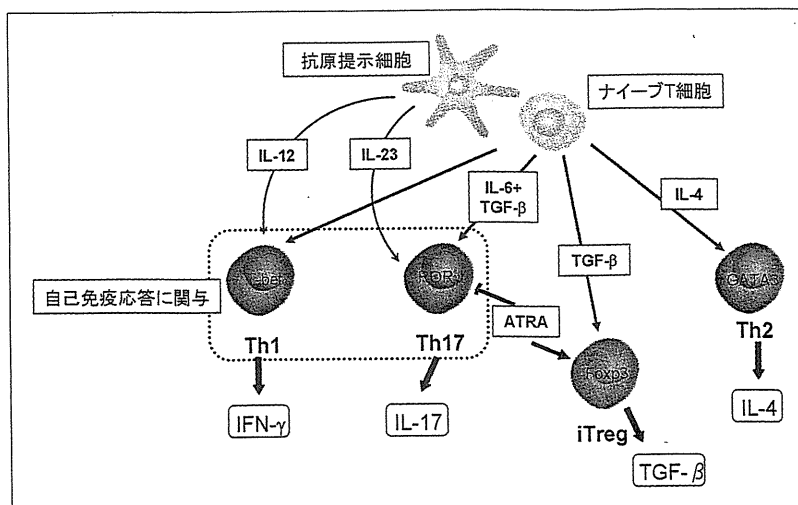


図1 ヘルパーT細胞の分化と機能

自己免疫応答の観点からは、IFN- γ 産生性のTh1細胞とIL-17産生性のTh17細胞は、いずれも自己免疫病態を引き起こす病原性T細胞集団であると考えられており、双方の細胞機能をコントロールできる新たな制御法の確立が重要な課題となっている。

1つの α 鎖が2~3種類の β 鎖と複合体を形成し、MHC類縁分子であるCD1d上に提示された特定の糖脂質を抗原として認識する。強力な外来性の糖脂質抗原としては α -ガラクトシルセラミド(α -GalCer)があるが、私たちは α -GalCerのスフィンゴシン鎖を短縮した改変糖脂質抗原OCHが、IFN- γ 産生を誘導することなくIL-4を産生させることで、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)や膠原病誘導性関節炎(CIA)などのマウス自己免疫疾患モデルに対して病態抑制効果を発揮することを見いだした。^{6,7)} さらに、 α -GalCerがIFN- γ とIL-4の産生をともに誘導する一方で、OCHが選択的にIL-4産生を誘導する分子機序に興味を持ち、そのメカニズムの解明を試みた。

実験を始めてまず分かったことは、 α -GalCerから徐々にスフィンゴシン鎖を短縮していくと、CD1d分子からの解離がより速やかになるということであった。そしてスフィンゴシン鎖が短くなると、iNKT細胞からのIL-4産生はあまり変わらないが、IFN- γ 産生が著しく減少した。また、iNKT細胞からのIFN- γ 産生はNF- κ Bファミリー分子c-Relの発現に依存しており、c-Rel発現にはより持続的な刺激が必要であることから、OCHはこれらの理由によりIL-4を選択的に誘導するものと結論付けた。⁸⁾ さらに、 α -GalCer刺激後のiNKT細胞

に発現したCD40Lを介して活性化した樹状細胞が産生するIL-12は、NK細胞などの周辺細胞からの二次的なIFN- γ 産生を誘導するのに対し、OCHはNKT細胞のCD40L発現を誘導しなかった。

一方、CpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG-ODN)などのTLRリガンドの存在下では、樹状細胞のIL-12産生とNK細胞のIFN- γ 産生が底上げされ、OCHによる選択的IL-4産生誘導効果は消失したことから、OCHの作用は生体の感染や炎症の状態に応じて変動することが示された(図2)。⁹⁾ CD1d分子には多型がなく、iNKT細胞を標的とした糖脂質療法は臨床応用上大きな利点を有しているが、その一方で望ましいサイトカイン産生のみを誘導すべく、生体の自然免疫応答状態を正確に把握することが重要と考えられた。引き続き進められた一連の研究により、現在当センターでMSを対象としたOCHの治験が開始されるに至っている。

2. レチノイン酸受容体を標的とした治療戦略

前述のとおり、近年Th17細胞機能制御を介した新規MS治療法の開発に期待が寄せられているが、最近ビタミンAの活性代謝産物であるall-transレチノイン酸(ATRA)が、Th17細胞分化を強力に抑制することが示された。¹⁰⁾ しかしATRAには極めて多様な生理機能があるうえ、脂肪組織などに容易に蓄積し血中濃度が速やかに低下することや、受

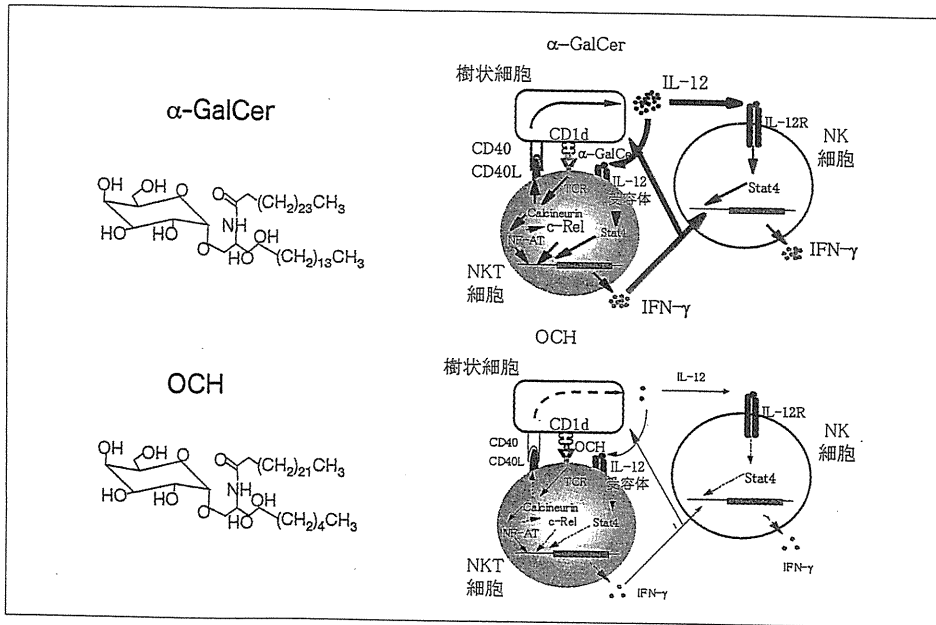


図2 NKT細胞に対する α GalCerとOCHの作用機序と選択的なサイトカイン産生
 α -GalCerとOCHの作用の違いは、NKT細胞に対する直接作用にとどまらず、周辺細胞を介した二次的な細胞応答にまで及ぶと考えられる。

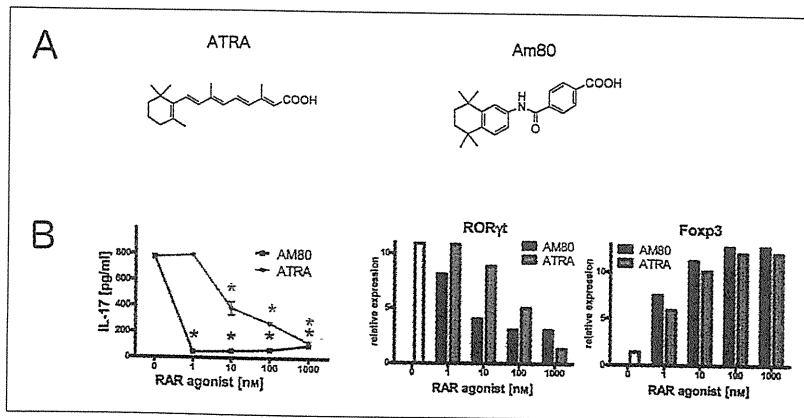


図3 Th17細胞依存性自己免疫応答に対するレチノイドの効果

A: レチノイン酸(ATRA)及びAm80の構造。B: ATRAあるいはAm80存在下にTh17細胞分化を誘導すると、Th17細胞マーカーROR γ tの発現とIL-17産生が顕著に抑制され、制御性T細胞マーカーFoxp3が相対的に増加する。Am80の作用は、相対的にATRAより強い。

容体選択性を欠くことによる副作用の可能性が、ATRAの臨床応用の拡大を阻んでいる。EAEの抑制に、比較的大量のATRAを腹腔内投与しないと効果が得られないことも分かっていた。

私たちは、比活性と受容体選択性に優れた合成レチノイドの中から、急性前骨髄球性白血病(APL)治療薬として我が国で承認されている合成レチノイドAm80(タミバロテン)が、ATRAをしのぐTh17細胞制御効果を有することを見いだした。¹¹⁾ マウス

脾臓由来ナイーブT細胞をTh17細胞分化条件下(IL-6+TGF- β)で抗CD3抗体刺激すると、数日以内に高いIL-17産生が誘導できる。ここにAm80あるいはATRAを添加すると、Th17細胞マーカー遺伝子であるROR γ t発現とIL-17産生が濃度依存的に抑制され、制御性T細胞マーカーであるFoxp3の発現が誘導された。Am80は、いずれの指標においてもATRAより強い効果を示した(図3)。EAEマウスにAm80を隔日経口投与する

と、発症前後の投与開始のいずれでも発症が有意に抑制された。このとき、自己抗原特異的な IL-17 産生が有意に抑制され、中枢神経系への Th 17 細胞の浸潤も低下していたことから、MS 治療薬候補としての期待が高まっている。¹²⁾

ところが、Am 80 を連投した EAE マウスでは、徐々に病態抑制効果が減弱する傾向が認められたため、その原因を探ることにした。予想に反して、Am 80 の連投により病態抑制効果が減弱した EAE マウスでも IL-17 産生は依然として抑制されており、病態抑制効果の消失は IL-17 産生抑制の解除によるものではなかった。実は Am 80 の長期投与により、免疫抑制性サイトカインである IL-10 の産生が有意に低下していた。IL-10 は、EAE 病態の回復期に働く重要な制御性サイトカインであることから、IL-10 の産生低下が病態抑制解除の原因である可能性が考えられ、Am 80 は IL-17 の関与が大きい急性期の病態への適用が望ましいと思われた。合成レチノイド Am 80 は、副作用のリスクだけでなく医薬品としての体内動態も ATRA より優れており、APL の治療薬として使用されていることから、適用拡大による有望な新規 MS 治療薬候補であると思われた。

3. オーフアン核内受容体 NR 4 A 2 の機能解析へ

以前に私たちが、DNA マイクロアレイを用いた MS 患者末梢血 T 細胞の網羅的遺伝子発現解析¹³⁾により同定したオーフアン核内受容体 NR 4 A 2 は、Nurr1 としても知られる核内受容体分子の 1

つであり、NGFB-I/Nur77 (= NR 4 A 1), NOR 1 (= NR 4 A 3) とともに NR 4 A ファミリーに属する。¹⁴⁾ NR 4 A ファミリー分子は様々な生体応答に関わり、免疫系においては、T 細胞で一過性に発現誘導される即時型遺伝子 (immediate early gene ; IEGs) として知られる以外、その機能の詳細は不明であった。NR 4 A ファミリー分子はオーフアン受容体であり、リガンド非依存的に転写活性化能を有するため、その機能は主に転写レベルで制御されると考えられる。さらに、NR 4 A 2 欠損マウスでは NR 4 A 1 や NR 4 A 3 と異なり、中脳のドパミン産生ニューロンの形成不全により胎児は生後すぐに死亡することからも、機能の独自性が強うかがわれる。EAE マウスの T 細胞でも NR 4 A 2 の発現が亢進することが分かったため、このモデルを用いて病態との関連を解析することにした。

EAE マウスの中枢神経系には IL-17 産生性の炎症性 T 細胞が多数浸潤することから、T 細胞の NR 4 A 2 発現と IL-17 産生との相関を検討した。レポーター解析や遺伝子導入実験から、NR 4 A 2 が発現すると *IL-17* 遺伝子の転写及び IL-17 産生が有意に亢進することが分かった。一方、RNA 干渉法により NR 4 A 2 発現を抑制すると、IL-17 産生は有意に抑制された。さらに、SJL マウスにプロテオリピッドプロテイン (PLP) 由来ペプチドを免疫して誘導した自己反応性 T 細胞を、siRNA 処理してからペプチドで再刺激し、ナイーブマウスに移入して

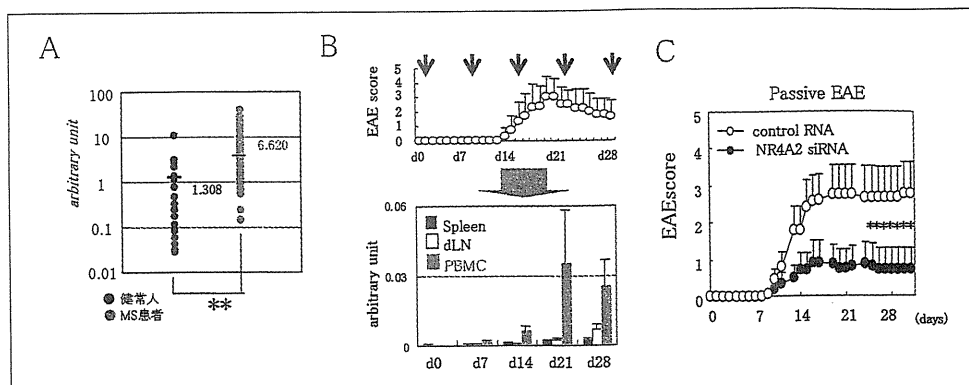


図4 Th 17 細胞依存性自己免疫応答における NR 4 A 2 の機能

A: MS 患者末梢血 T 細胞では、有意な NR 4 A 2 発現の亢進を認める (定量 PCR 法)。B: EAE マウスの末梢血 T 細胞でも、病態に相関した NR 4 A 2 の発現上昇が認められる。C: PLP ペプチド免疫 10 日後の SJL マウスより分離した所属リンパ節細胞に、NR 4 A 2 特異的 siRNA あるいはコントロール RNA を遺伝子導入した後、PLP ペプチドで再刺激して得られた細胞を、放射線照射したナイーブ SJL マウスに移入して EAE を誘導した。

EAEを発症させる (passive EAE モデル) と、対照 T 細胞に比べて T 細胞の病原性が有意に低下した (図 4).¹⁵⁾ NR 4 A 2 の発現制御あるいは機能制御により MS 病態が制御できる可能性が示された。

RNA 干渉法を用いた核酸医薬の臨床応用には多くの課題があり、現行の治験も局所投与にとどまっているが、今回用いた siRNA の配列はヒト・マウス間で完全に保存されており、両種の T 細胞にも効果があったことから、siRNA の臨床応用につながる技術基盤の底上げを期待したい。

NR 4 A 2 のリガンド結合領域は不活性化されていると予想されるが、実は抗がん剤として用いられている 6-メルカプトプリンには NR 4 A 2 の転写活性増強能が報告されていることなどからも、活性を制御する小分子化合物を探索していく価値は十分にある。興味深いことに、NR 4 A 2 は T 細胞における抗原刺激や種々の生体因子による刺激のみならず、ストレス負荷や運動に伴う物理刺激などでも誘導される。心的ストレスや過剰な運動とこれに伴う過労は典型的な MS の増悪因子であり、本来無関係な刺激が T 細胞の NR 4 A 2 発現を誘導し、結果的に自己免疫疾患の引き金となる可能性があるのではないだろうか。今後の研究を通じて、このような神経と免疫の関わりが明らかとなれば興味深い。

3 おわりに

私たちは、主に病原性 T 細胞の機能制御を標的とした新規 MS 治療戦略の探索を対象に研究を進めているが、これには 3 つの理由がある。第一に、自己免疫病である MS の根治療法の確立には、主病因である病原性 T 細胞の機能制御を標的とするのが本筋だと考えるからである。あるいは、そのようなアプローチが根治療法への唯一の道ではないかとい

う気さえしている。第二に、免疫学が現在のように急速に発展し、結果として様々な抗体医薬が続々と臨床応用されていく中で、免疫担当細胞そのものを標的とした治療法を臨床応用の俎上にのせたいという強い思いがある。このような観点から、タイサブリや FTY 720 にも大きく期待をしている。

そして第三の理由としては、このようなアプローチによって確立される MS の治療法は、恐らく免疫応答の制御の破綻が背景に潜む他の複数の自己免疫疾患に (少なくとも部分的には) 適用できるのではないかと期待するからである。自己免疫疾患の多くは比較的まれな難病であり、個別の疾患を対象とした治療法開発は、人的あるいは資金的な制約から簡単には進まない現状があることから、共通する病因を探りあてることに極めて大きなメリットがある。もちろん個別の疾患には特有の病因があり、あらゆる自己免疫疾患に普遍的に適用できる方法は望めないが、できる限り幅広い適用範囲を持つ画期的な治療法を目指して、研究を進めていきたいと考えている。

文 献

- 1) Aranami T, Yamamura T, *Allergol. Int.*, 57, 115-120 (2008).
- 2) McFarland H. F., Martin R, *Nat. Immunol.*, 8, 913-919 (2007).
- 3) Korn T. *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.*, 8, 8 (2009).
- 4) Sakaguchi S. *et al.*, *Cell*, 133, 775-787 (2008).
- 5) Kronenberg M., *Annu. Rev. Immunol.*, 23, 877-900 (2005).
- 6) Chiba A. *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 50, 305-313 (2004).
- 7) Miyamoto K. *et al.*, *Nature*, 413, 531-534 (2001).
- 8) Oki S. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 113, 1631-1640 (2004).
- 9) Oki S. *et al.*, *Int. Immunol.*, 17, 1619-1629 (2005).
- 10) Mucida D. *et al.*, *Science*, 317, 256-260 (2007).
- 11) Klemann C. *et al.*, *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, 32, 20-28 (2009).
- 12) Klemann C. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 174, 2234 (2009).
- 13) Satoh J. *et al.*, *Neurobiol. Dis.*, 18, 537-550 (2005).
- 14) Maxwell M. A., Muscat G. E., *Nucl. Recept. Signal*, 4, e 002 (2006).
- 15) Doi Y. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105, 8381-8386 (2008).

Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 1 Modulates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis via an iNKT Cell-Dependent Mechanism

Mayumi Fujita,* Takao Otsuka,*[†] Miho Mizuno,*
Chiharu Tomi,* Takashi Yamamura,*
and Sachiko Miyake*

From the Department of Immunology,* National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo; and the Third Department of Internal Medicine,[†] Tokyo Medical University, Tokyo, Japan

Carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 (CEACAM1) is a CEA family member that has been reported to have an important role in the regulation of Th1-mediated colitis. In this study, we examined the role of CEACAM1 in an animal model of multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Treatment of C57BL/6J mice with CEACAM1-Fc fusion protein, a homophilic ligand of CEACAM1, inhibited the severity of EAE and reduced myelin oligodendrocyte glycoprotein-derived peptide (MOG₃₅₋₅₅)-reactive interferon- γ and interleukin-17 production. In contrast, treatment of these animals with AgB10, an anti-mouse CEACAM1 blocking monoclonal antibody, generated increased severity of EAE in association with increased MOG₃₅₋₅₅-specific induction of both interferon- γ and interleukin-17. These results indicated that the signal elicited through CEACAM1 ameliorated EAE disease severity. Furthermore, we found that there was both a rapid and enhanced expression of CEACAM1 on invariant natural killer T cells after activation. The effect of CEACAM1-Fc fusion protein and anti-CEACAM1 mAb on both EAE and MOG₃₅₋₅₅-reactive cytokine responses were abolished in invariant natural killer T cell-deficient $\alpha 18^{-/-}$ mice. Taken together, the ligation of CEACAM1 negatively regulates the severity of EAE by reducing MOG₃₅₋₅₅-specific induction of both interferon- γ and interleukin-17 via invariant natural killer T cell-dependent mechanisms. (*Am J Pathol* 2009, 175:1116–1123; DOI: 10.2353/ajpath.2009.090265)

Carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 (CEACAM1), also known as CD66a, is one of the carcinoembryonic antigen family members and is expressed in epithelial cells, endothelial cells, and hematopoietic cells such as monocytes, dendritic cells, natural killer (NK) cells, B cells, and activated T cells.^{1–4} It is involved in intercellular adhesion through homophilic or heterophilic interactions and mediates regulatory functions in cellular growth and differentiation. Several splice variants of CEACAM1 have been detected, that differ with respect to the number of extracellular immunoglobulin-like domains, membrane anchorage, and the length of their cytoplasmic tail.³ Isoforms of CEACAM1 with a long cytoplasmic tail (CEACAM1-L) contain two immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs and have been shown to negatively regulate epithelial cell activation and tumor cell growth.^{3–5} Recently, the specific function of CEACAM1 as a regulator of T cells has been reported *in vitro* and *in vivo*.^{6–12} Mice treated with CEACAM1-Fc fusion protein, a homophilic ligand for CEACAM1 that stimulates the signal from CEACAM1, exhibited an immunosuppressive effect on Th1-mediated colitis *in vivo*, with reduced interferon (IFN)- γ production and T-bet activation.¹² However, the significance of CEACAM1 on other inflammatory autoimmune disease models remains unclear.

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is an inflammatory demyelinating disease induced by sensitization against central nervous system (CNS) components such as myelin oligodendrocyte glycoprotein

Supported by Grant-in-Aid for Scientific Research (B: 7210 to S.M.) from the Japan Society for the Promotion of Science, and the Health and Labour Sciences Research Grants on Research on Psychiatric and Neurological Diseases and Mental Health (to T.Y.) from the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan.

M.F. and T.O. contributed equally to this work.

Accepted for publication May 21, 2009.

Address reprint requests to Sachiko Miyake, Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan. E-mail: miyake@ncnp.go.jp.

(MOG).¹³ Because the neurological signs of paralysis can be monitored continuously, and demyelinating lesions resemble those found in multiple sclerosis, EAE is considered an animal model of the human demyelinating disease multiple sclerosis.¹³⁻¹⁶ Numerous studies have reported that EAE is mediated by CD4⁺ Th1 cells that produce IFN- γ .¹³⁻¹⁶ Recently, this idea was questioned because animals deficient in IFN- γ , IFN- γ receptor, or signal transducer and activator of transcription 1 were still found to develop EAE.¹⁷⁻²¹ These data led the identification of an interleukin (IL)-23 derived population of Th cells, IL-17-producing Th17 cells, as alternative potent inducers of severe autoimmunity, including EAE.²²⁻²⁴ However, mice deficient in T-bet and signal transducer and activator of transcription 4, which thus lack Th1 cells, but have large numbers of Th17 cells, are still resistant to EAE.^{21,25} Additionally, Th1 and Th17 cells are observed in the CNS at the peak of EAE and diminish after the recovery.²⁶ It has now been described that Th1 and Th17 cells might cooperate to induce the development of EAE.²⁷⁻²⁹ Thus, elucidation of the mechanisms that regulate the production of both Th1 and Th17 cytokines is important in relation to the regulation of EAE.

In this study, we investigated the role of CEACAM1 in EAE either by CEACAM1 ligation with a homophilic ligand for CEACAM1 (CEACAM1-Fc fusion protein), or by blocking with a CEACAM1-specific antibody, AgB10. Here, we demonstrate that signaling through CEACAM1 suppressed MOG-derived peptide (MOG₃₅₋₅₅)-induced EAE associated with a reduction in MOG₃₅₋₅₅-specific T cell production of IFN- γ and IL-17. Moreover, we have identified invariant natural killer T (iNKT) cells as a critical component in CEACAM1-mediated suppression of EAE. iNKT cells are a unique subset of CD1-restricted T cells that express an invariant T cell receptor (TCR) α chain, composed of V α 14-J β 18 segments in mice and V α 14-J β 18 segments in humans, and use a restricted set of V β genes.³⁰⁻³¹ Due to the ability to produce a wide variety of cytokines, iNKT cells are thought to play regulatory roles in autoimmune diseases.³² CEACAM1-mediated suppression of EAE was not observed in iNKT cell-deficient *J α 18^{-/-}* mice, and MOG₃₅₋₅₅-specific T cell production of IFN- γ and IL-17 was not modified in *J α 18^{-/-}* mice when treated with either CEACAM1-Fc fusion protein or AgB10.

Materials and Methods

Animals and Reagents

C57BL/6J (B6) mice were obtained from CLEA Japan Inc. (Tokyo, Japan). *J α 18^{-/-}* mice were kindly provided by Dr. M. Taniguchi (RIKEN, Tokyo, Japan). All animals were maintained in specific pathogen-free conditions in accordance with institutional guidelines of National Institute of Neuroscience, Tokyo, Japan. MOG₃₅₋₅₅ (amino acid sequence, MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) was synthesized at Toray Research Center (Tokyo, Japan). Incomplete Freund's adjuvant and heat-killed *mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) were obtained from Difco Laborato-

ries (Detroit, Michigan), and pertussis toxin was obtained from List Biological Laboratories (California). The hybridoma producing CEACAM1-specific antibody, AgB10,³³ was kindly provided by Nicole Beauchemin (McGill Cancer Center), and 293 EBNA cells transfected pCEP4-N-CEACAM-Fc, which produce a homophilic ligand of CEACAM1, CEACAM1-Fc fusion protein were kindly provided by Thomas M. Gallagher (Loyola University Medical Center).³⁴

Induction and Evaluation of EAE

EAE was induced in mice as described previously.³⁵ Briefly, mice were immunized subcutaneously with 100 μ g of MOG₃₅₋₅₅ emulsified in incomplete Freund's adjuvant containing 500 μ g of *M. tuberculosis*. Directly after the immunization and 48 hours later, mice were injected intraperitoneally with 200 ng of pertussis toxin. Clinical signs of EAE were assessed daily with a 0 to 6 scoring system (0, no signs; 1, partial loss of tail tonicity; 2, completely limp tail and abnormal gait; 3, partial hindlimb paralysis; 4, complete hindlimb paralysis; 5, fore- and hindlimb paralysis or moribund state; 6, dead).

Preparation of Antibody and Fusion Protein

The hybridomas producing AgB10 were cultured in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mmol/L L-glutamine, and 100 U/ml penicillin/streptomycin. The supernatants were collected and AgB10 was affinity-purified using a protein A column according to the manufacturer's instructions (Millipore, MA). 293 EBNA cells transfected pCEP4-N-CEACAM1-Fc were cultured in DMEM containing 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mmol/L L-glutamine, and 100 U/ml penicillin/streptomycin. CEACAM1-Fc fusion protein was affinity-purified using protein G column from the collected supernatants (Amersham Bioscience, NJ).

MOG₃₅₋₅₅-Specific T Cell Response and Cytokine Assay

After immunization with MOG₃₅₋₅₅, mice were treated intraperitoneally with the indicated compounds, either 250 μ g of AgB10 or 250 μ g of control rat IgG antibody (Jackson Immuno Research, PA), or either 250 μ g of CEACAM1-Fc fusion protein or 250 μ g of a chimeric (mouse/human) anti-human CD20 mAb (rituximab) every second day from the day of immunization, day 0, to day 11. The animals were sacrificed at day 11 and inguinal and popliteal lymph nodes (LN) were sampled. Total LN cells were suspended in RPMI 1640 medium containing 2% syngeneic mouse serum, 2 mmol/L L-glutamine, 5 \times 10⁻⁵ M/L 2-mercaptoethanol, and 100 U/ml penicillin/streptomycin, and were incubated in 96-well plates with 1 \times 10⁶ cells/well in the presence of 0, 1, 10, 30, or 100 mg/ml of MOG₃₅₋₅₅. Culture supernatant was collected 48 hours after stimulation, and IFN- γ and IL-17 in the

supernatant were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using OptEIA kit (BD Bioscience, CA) and IL-17 ELISA kit (R&D systems), respectively.

Histology

Sixteen days after the immunization with MOG₃₅₋₅₅, the spinal cords were sampled and stored in 10% formaldehyde. Paraffin-embedded spinal cords were stained with either H&E or luxol fast blue.

Flow Cytometry

Liver mononuclear cells from B6 mice were isolated by Percoll density-gradient centrifugation. 1×10^6 cells/well were stimulated with 1 mg/ml plate-bound anti-CD3 mAb and 2.5 mg/ml Concanavalin A (ConA) in 96-well plates and collected for the use of flow cytometry. Cells were stained with α -galactosylceramide (α -GC) loaded dimeric mouse CD1 days followed by fluorescein isothiocyanate-conjugated AgB10, phycoerythrin-conjugated mAb A85-1, and allophycocyanin-conjugated anti-TCR β -chain. iNKT cells were gated as α -GC loaded CD1 days dimmer and TCR β double-positive cells, and T cells were gated as TCR β single-positive cells. Stained cells were analyzed using a FACSCalibur with CellQuest Software (Becton Dickinson, CA).

In Vivo Injection of α -GC

B6 mice were treated intraperitoneally with either 500 μ g of AgB10 or 500 μ g of control rat IgG antibody. Four days after the treatment, 250 μ l of blood was collected at 2 or 6 hours after intravenous injection with 0.6 μ g α -GC/dimethyl sulfoxide or control dimethyl sulfoxide. Blood samples were centrifuged at 3000 rpm for 30 minutes at 4°C, and serum was collected and IFN- γ and IL-4 were determined using ELISA kit (BD Bioscience, CA).

Statistics

EAE clinical scores for groups of mice are presented as the mean group clinical score \pm SEM, and statistical differences were analyzed by the Mann-Whitney U non-parametric ranking test. Data for cytokines were analyzed with the two-way analysis of variance. In appropriate cases, post hoc comparisons were made.

Results

CEACAM1 Has a Role in Ameliorating EAE

To assess the role of CEACAM1 on EAE, we first examined the effect of CEACAM1-Fc fusion protein encoding the extracellular portion of the mCEACAM1-4L. CEACAM1-Fc fusion protein has been demonstrated to homophilically ligate the CEACAM1 molecule, which has been shown to inhibit IFN- γ production.¹² As shown in

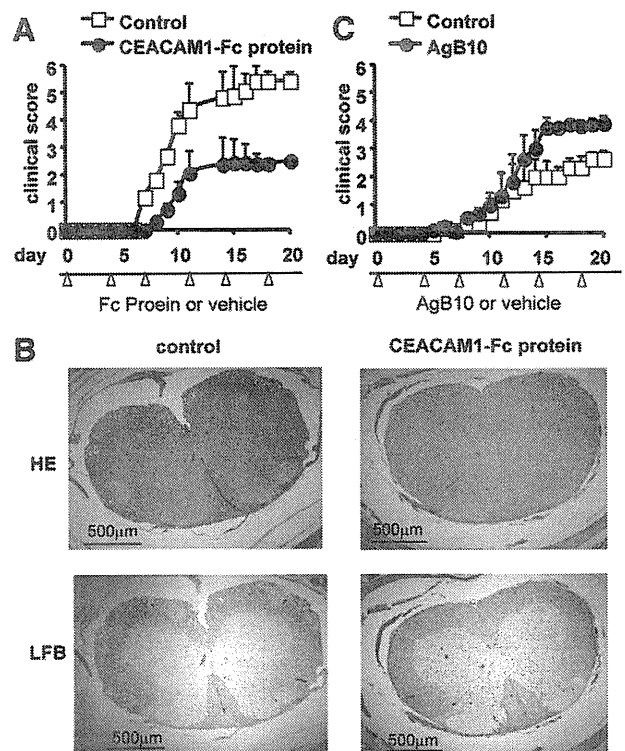


Figure 1. Effect of CEACAM1-Fc fusion protein or CEACAM1-specific antibody on MOG-induced EAE. EAE was induced in B6 mice by immunization with MOG₃₅₋₅₅. CEACAM1-Fc fusion protein (A) or a mAb for CEACAM1, AgB10 (C) was given twice per week starting from the day of immunization. **Arrowheads** indicate the time point of administration of CEACAM1 Fc fusion protein or AgB10. * $P < 0.05$ vs. Control. The results represent the means \pm SEM of eight mice per group. Representative data from two separate experiments is demonstrated. **B:** Histopathological assessment of the CNS region in the spinal cord of control or CEACAM1-Fc fusion protein-treated mice on day 16. Paraffin-embedded spinal cords were stained with H&E (**upper panels**) or luxol fast blue (LFB) (**lower panels**). Scale bar = 500 μ m.

Figure 1A, administration of CEACAM1-Fc fusion protein significantly inhibited the development and the progression of EAE compared with control mice.

To characterize the immunosuppressive effect of CEACAM1, we performed the pathological analysis of CNS inflammation and demyelination in EAE-induced mice treated with CEACAM1-Fc fusion protein (Figure 1B). Histological examination of the spinal cord 16 days after EAE induction revealed less cellular infiltration and demyelination in CEACAM1-Fc fusion protein-treated mice, as compared with control mice.

We next examined the effects of CEACAM1 specific antibody, AgB10, on the development and progression of MOG₃₅₋₅₅-induced EAE in B6 mice (Figure 1C). Ligation of CEACAM1, either homophilically by CEACAM1-Fc fusion protein or heterophilically by microbial components such as the spike glycoprotein of murine hepatitis virus, has been demonstrated to inhibit the proliferation and cytokine production of T cells.⁶⁻¹² In contrast, AgB10 has been reported to enhance the T cell proliferation, indicating that AgB10 acts as a blocking antibody. As expected, the clinical scores of EAE were augmented in the mice treated with AgB10 compared with those of control mice.

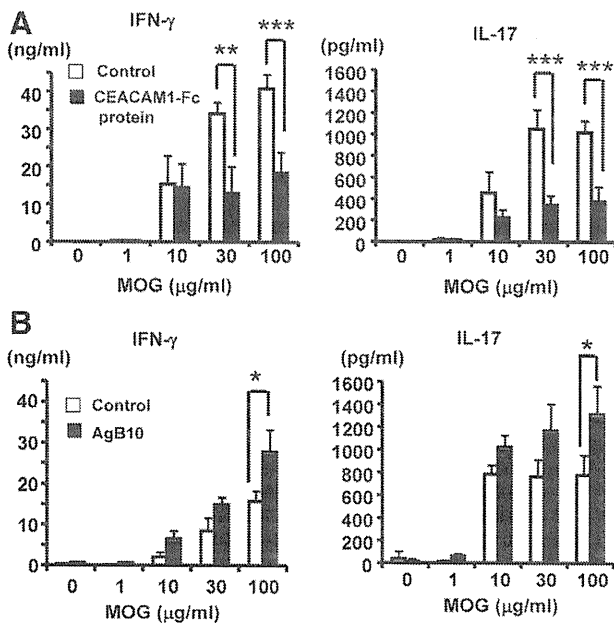


Figure 2. MOG₃₅₋₅₅-specific T cell responses in mice treated with CEACAM1-Fc fusion protein or with AgB10. B6 mice were treated with CEACAM1-Fc fusion protein (A) or AgB10 (B) twice per week from the day of immunization with MOG₃₅₋₅₅. Eleven days after the immunization, draining lymph node cells were incubated with MOG₃₅₋₅₅. Supernatants were collected from the culture and measured for the concentration of IFN-γ and IL-17 by ELISA. Data represent the mean ± SEM of samples from one of two independent experiments (*n* = 3 mice). **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs. Control.

These results indicate that signals through CEACAM1 suppressed both the clinical and the pathological severity of EAE.

The Signal through CEACAM1 Reduces MOG₃₅₋₅₅-Specific IFN-γ and IL-17 Production

Since MOG₃₅₋₅₅ induced EAE is thought to be mediated by MOG₃₅₋₅₅-specific Th1 and Th17 cells, we next examined MOG₃₅₋₅₅-specific T cell responses in CEACAM1-Fc fusion protein-treated (Figure 2A), or AgB10-treated mice (Figure 2B). We immunized mice with MOG₃₅₋₅₅ and treated them with either AgB10 or CEACAM1-Fc fusion protein. Twelve days later, we harvested LN cells and restimulated them with MOG₃₅₋₅₅ peptide *in vitro* to examine cytokine production and proliferation. Compared with cells from the control mice, LN cells obtained from CEACAM1-Fc fusion protein treated mice were significantly inhibited in IFN-γ and IL-17 production in responses to MOG₃₅₋₅₅ restimulation (Figure 2A). IL-4 was not detected in the supernatant. On the other hand, *in vivo* treatment with AgB10 showed an enhancement of IFN-γ and IL-17 production in response to MOG₃₅₋₅₅ stimulation (Figure 2B). Proliferative responses were not significantly different between control mice, CEACAM1-Fc protein-treated, or AgB10-treated mice (data not shown).

These results indicate that the suppressive effect of CEACAM1 on EAE was associated with reduction of MOG₃₅₋₅₅-specific IFN-γ and IL-17 production.

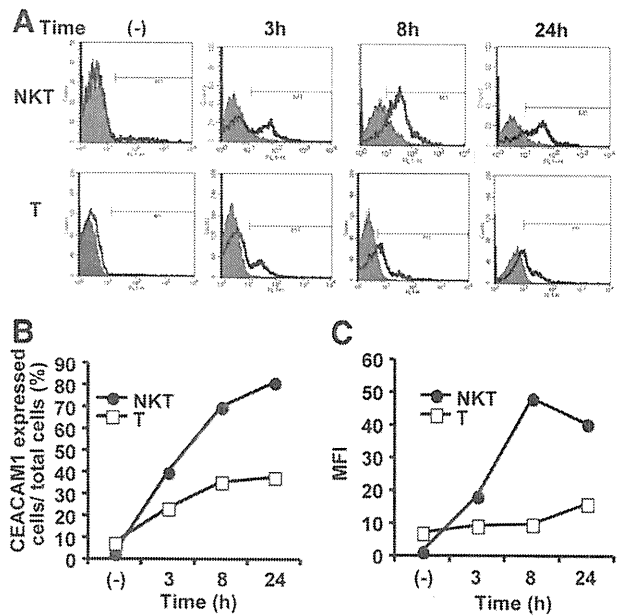


Figure 3. Expression of CEACAM1 on iNKT and T cells, after activation with ConA and anti-CD3 antibody. The histograms show the log fluorescence intensity of CEACAM1 on the surface of iNKT and T cells at the indicated time points after the activation with a combined treatment of ConA and plate bounded anti-CD3 antibody (A). The black curves indicate the fluorescence intensity of CEACAM1 on the surface of nontreated cells, and the gray silhouettes show the intensity of activated cells with ConA and anti-CD3 antibody. iNKT cells were gated as α-GC loaded CD1 dimmer and TCRβ double-positive cells, and T cells were gated as TCRβ-positive cells, respectively. The percentage of CEACAM1-expressing cells within total iNKT or T cells and mean fluorescence intensity of the expression at the indicated time points were shown in graph (B).

Rapid Expression of CEACAM1 on iNKT Cells after Activation

It has been reported that CEACAM1 is expressed on T cells early after activation, and its ligation directly inhibits IFN-γ production by such T cells. We therefore examined the time course of CEACAM1 expression by T cells *in vitro*. As reported previously, CEACAM1 expression was observed on T cells several hours after activation with ConA and anti-CD3 mAb *in vitro*. Moreover, we observed that there was a rapid and higher expression of CEACAM1 by CD1-restricted iNKT cells after activation (Figure 3A). The log fluorescence intensity of CEACAM1 on surface of iNKT and T cells and the percentage of CEACAM1 expressed cells within total iNKT or T cells showed a rapid and also enhanced expression of CEACAM1 on iNKT cells compared with T cells after activation (Figure 3B).

CEACAM1 Regulates IFN-γ Production from iNKT Cells

iNKT cells possess the ability to produce a wide variety of cytokines. Activation of iNKT cells is known to lead to either suppressive or stimulatory immune responses depending on the type of cytokine they produce.³⁰ We have demonstrated the rapid and enhanced expression of CEACAM1 specifically on iNKT cells (Figure 3A). Thus we next examined whether or not the administration of

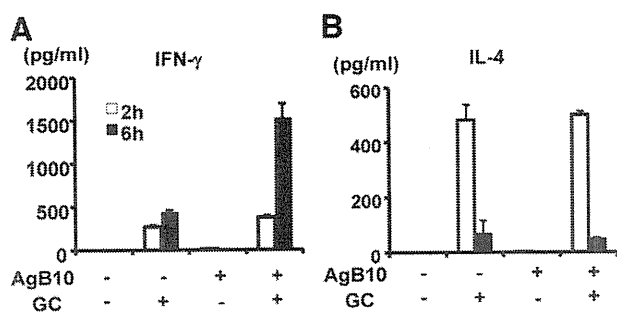


Figure 4. Effect of AgB10 on serum cytokine levels after *in vivo* injection with α -galactosylceramide (α -GC). B6 mice were treated with either AgB10 or control antibody. Four days after the treatment, serum was collected at 2 or 6 hours after intravenous injection of α -GC. Serum levels of IFN- γ and IL-4 were measured by ELISA. Increased levels of IFN- γ were observed in AgB10- α -GC treated mice compared with the control antibody- α -GC treated mice (A), whereas no alterations in the level of IL-4 were detected (B). Data represent the mean \pm SEM of samples from one of three independent experiments ($n = 3$ mice). *** $P < 0.001$ vs. Control. The results represent the mean concentrations \pm SEM of three mice per group.

AgB10 has an effect on cytokine production by iNKT cells. Mice were injected intravenously with iNKT cell-specific ligand, α -GC, or vehicle, and serum levels of IFN- γ and IL-4 were measured. Mice pretreated with AgB10 and injected with α -GC showed significantly increased level of IFN- γ , as compared with mice treated with control antibody and injected with α -GC (Figure 4A). No significant difference was observed in IL-4 production (Figure 4B). The level of IL-12 in serum was not altered in AgB10-treated mice, and IL-17, IL-21, or IL-23 were not detected in the serum (data not shown). The results suggest that the signal from CEACAM1 have a role in IFN- γ production by iNKT cells.

The Modulation of EAE by CEACAM1 Was Abrogated in iNKT Cell-Deficient *J α 18*^{-/-} Mice

Since iNKT cells highly express CEACAM1 after activation, it was of interest to investigate whether the iNKT cells are involved in CEACAM1-mediated amelioration of EAE. To address this question, we examined the effect of CEACAM1-Fc fusion protein on the development of MOG₃₅₋₅₅-induced EAE in *J α 18*^{-/-} mice, which genetically lack iNKT cells. In contrast to B6 mice, no alteration in the severity of EAE was observed in CEACAM1-Fc fusion protein treated *J α 18*^{-/-} mice, as compared with control mice (Figure 5A). To further determine the effect of the ligation of CEACAM1 on EAE in *J α 18*^{-/-} mice, we analyzed the CNS inflammation and demyelination in EAE-induced *J α 18*^{-/-} mice treated with CEACAM1-Fc fusion protein. In contrast to wild-type B6 mice, histological examination of the spinal cord of *J α 18*^{-/-} mice showed cellular infiltration and demyelination to a similar extent as sham-treated mice (Figure 5B). We next induced EAE in *J α 18*^{-/-} mice treated with either AgB10 or control antibody. Again, no suppression of clinical EAE was observed in AgB10-treated *J α 18*^{-/-} mice, as compared with the control mice (Figure 5C).

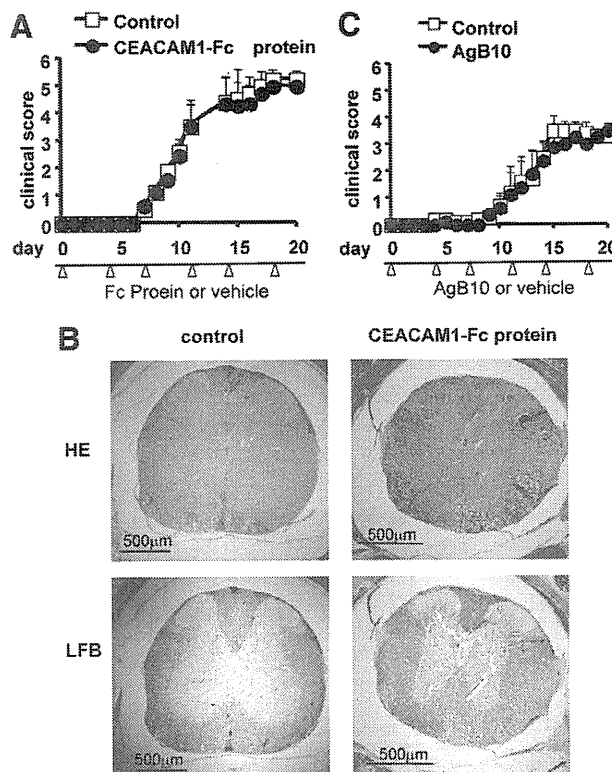


Figure 5. Effect of CEACAM1-Fc fusion protein or CEACAM1-specific antibody on EAE induced in *J α 18*^{-/-} mice. EAE was induced in *J α 18*^{-/-} mice by immunization with MOG₃₅₋₅₅. CEACAM1-Fc fusion protein (A) or AgB10 (C) was given twice per week starting from the day of immunization. **Arrowheads** indicate the time point of administration of CEACAM1-Fc fusion protein or AgB10. The results represent the means \pm SEM of eight mice per group. Representative data from two separate experiments is demonstrated. **B:** Histopathological assessment of the CNS region in *J α 18*^{-/-} mice induced with EAE. Shown are cellular infiltration and demyelination of the spinal cord of control or CEACAM1-Fc fusion protein-treated mice on day 16. Paraffin-embedded spinal cords were stained with H&E (upper panel) or LFB (lower panels). Scale bar = 500 μ m.

These data show that CEACAM1 signal modulation does not affect on the severity of clinical and pathological EAE in mice lacking iNKT cells.

The Modulation of MOG₃₅₋₅₅-Specific IFN- γ and IL-17 Production by CEACAM1 Required iNKT Cells

The suppression of EAE by the ligation of CEACAM1 in B6 mice was associated with a reduction in MOG₃₅₋₅₅-specific IFN- γ and IL-17 production. We next examined MOG₃₅₋₅₅-specific T cell responses in CEACAM1-Fc fusion protein-treated (Figure 6A), or AgB10-treated *J α 18*^{-/-} mice (Figure 6B) by *ex vivo* re-challenge with MOG₃₅₋₅₅ on day 11 after the immunization of MOG₃₅₋₅₅. In contrast to B6 mice, LN cells from CEACAM1-Fc fusion protein-treated *J α 18*^{-/-} mice exhibited no significant reduction of MOG₃₅₋₅₅ specific IFN- γ and IL-17 production compared with the control mice (Figure 6A). Additionally, *in vivo* treatment of *J α 18*^{-/-} mice with AgB10 also did not significantly enhance of MOG₃₅₋₅₅-specific T cell IFN- γ and IL-17 production (Figure 6B).

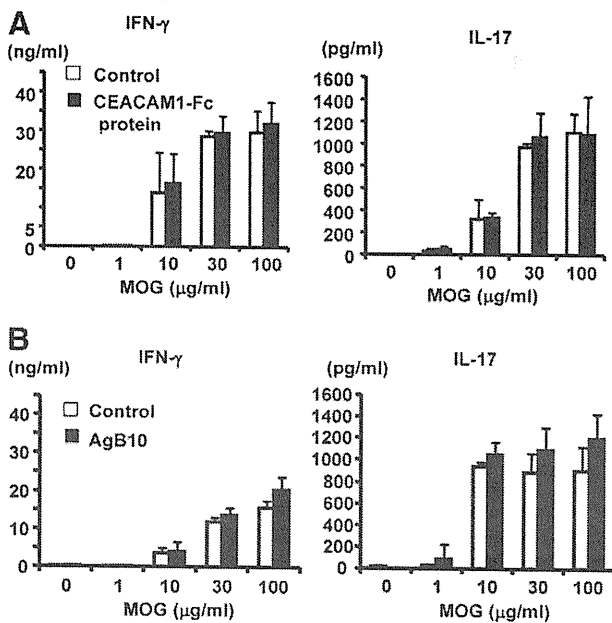


Figure 6. MOG₃₅₋₅₅-specific T cell responses in *Jα18^{-/-}* mice treated with CEACAM1-Fc fusion protein or with AgB10. *Jα18^{-/-}* mice were treated with CEACAM1-Fc fusion protein (A) or AgB10 (B) twice per week from the day of immunization with MOG₃₅₋₅₅. Eleven days after the immunization, draining lymph node cells were incubated with MOG₃₅₋₅₅. Supernatants were collected from the culture and measured for the concentration of IFN-γ and IL-17 by ELISA. Data represent the mean ± SEM of samples from one of two independent experiments (*n* = 3 mice).

These results indicate that iNKT cells play an important role in CEACAM1-mediated reduction of MOG-specific IFN-γ and IL-17 production.

Discussion

The present study demonstrated that the signal through CEACAM1 suppressed EAE in association with a reduction in MOG₃₅₋₅₅-specific production of IFN-γ and IL-17. Moreover, we showed that CEACAM1 was expressed at an early time point by iNKT cells after activation and CEACAM1 also affected the cytokine production by iNKT cells, including IFN-γ, but not IL-4. Finally, we demonstrated that CEACAM1-mediated modulation of EAE and MOG₃₅₋₅₅-specific cytokine production required iNKT cells.

Since both IFN-γ and IL-17 are known as potent inducers of EAE,^{21,27-29} CEACAM1-mediated reduction of these cytokines is thought to have a significant role in ameliorating EAE. Although the mechanisms of IFN-γ and IL-17 reduction in CEACAM1-mediated suppression of EAE are not clearly defined so far, we found that the effects of AgB10 and CEACAM1-Fc fusion proteins on EAE and MOG₃₅₋₅₅-reactive cytokine responses were abolished in iNKT cell-deficient *Jα18^{-/-}* mice. Thus we concluded that CEACAM1-mediated suppression of EAE was mediated via iNKT cells. Activation of iNKT cells are known to modulate dendritic cell functions, and Kammerer et al reported that AgB10 triggered release of IL-12 from dendritic cells and facilitated priming of naive CD4⁺ T cells with a Th1-like phenotype.³⁶ In contrast,

Iijima et al showed that CEACAM1-mediated inhibition of Th1-mediated colitis was not dependent on the modulation of IL-12, consistent with this finding, IL-12 was not affected in EAE-induced mice by the *in vivo* treatment of AgB10. Since iNKT cells have been shown to produce IL-21, which promotes the development of Th17 cells,³⁷ CEACAM1 expression by iNKT cells may have a regulatory role in IL-17 production by Th17 cells via IL-21. However, the production of IL-21 upon iNKT cell activation was not altered by treatment with AgB10. In addition, production of IL-23, which promotes Th17 cell maintenance by activated iNKT cells was not altered in mice treated with AgB10, as compared with control mice. Therefore, the mechanisms how CEACAM1-treated iNKT cells modulate MOG₃₅₋₅₅ reactive Th1 and Th17 cells remain to be elucidated.

Recently, Mars et al reported that activation of iNKT cells with α-GarCer during priming of the CD4⁺ T cell response prevents the differentiation of naive CD4⁺ T cells toward the Th17 lineage, and the cytokine neutralization experiments indicated that IL-4, IL-10, and IFN-γ are involved in the iNKT cell-mediated regulation of T cell lineage development.³⁸ Although the direct mechanisms of iNKT cells in regulating the Th17 compartment are still in question, iNKT cells were shown to have a regulatory role in development of the Th17 lineage. Our laboratory reported that antibiotic treatment alters the composition of gut flora, resulting in amelioration of EAE in a iNKT cell-dependent manner.³⁹ iNKT cell-dependent amelioration of EAE was associated with the suppression of MOG₃₅₋₅₅-reactive Th17 cells, although the mechanism by which iNKT cells modulate MOG₃₅₋₅₅-reactive Th17 cells remained unclear. It was speculated that altering the compositions of gut flora by antibiotic treatment critically influences the function of iNKT cells, which resulted in a reduction of MOG₃₅₋₅₅-reactive Th17 cells. Since various bacterial and viral pathogens *trans*-ligate CEACAM1 and suppresses the activation and proliferation of T cells, it is possible that the alteration of cytokine production in physiological or pathological conditions is partly dependent on the way of *trans*-ligation of pathogens and CEACAM1 on iNKT cells.^{3,12,40-45}

In conclusion, this study demonstrates for the first time that CEACAM1 negatively regulates the severity of EAE via an iNKT cell-dependent mechanism. Considering that the selective induction of cytokines by iNKT cells by synthetic ligands has been reported to suppress EAE,^{32,46} CEACAM1 may prove to be a novel target for immunotherapy of multiple sclerosis.

Acknowledgments

We thank Masaru Taniguchi at Riken Research Center for Allergy and Immunology (Yokohama, Japan) for providing *Jα18^{-/-}* mice. We thank Thomas M. Gallagher at Loyola University Medical Center (Maywood, IL) for providing 293 EBNA cells transfected with pCEP4-N-CEACAM1-Fc. We thank Nicole Beauchemin (McGill Cancer Center). We are grateful to Ben J.E. Raveney for critical reading of the manuscript.