

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590095
 研究課題名（和文） 合成糖脂質によるNKT細胞を介した免疫応答調節システムの新規開発に関する研究
 研究課題名（英文） Immunoregulatory roles of glycolipid ligand-stimulated natural killer T cells
 研究代表者
 大木 伸司（OKI SHINJI）
 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第六部・第三室長
 研究者番号：50260328

研究成果の概要：

ナチュラルキラーT（NKT）細胞は、抗原である糖脂質分子を認識して活性化すると、様々なサイトカインを産生し、生体の免疫応答を調節する。我々は、活性化NKT細胞が炎症性サイトカインであるIL-17を産生することを見出したが、種々のレチノイドがNKT細胞やT細胞のIL-17産生を、効果的に抑制することを発見した。レチノイドによるIL-17依存性自己免疫疾患に対する新たな治療法の可能性が示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	1,800,000	540,000	2,340,000
平成20年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：①免疫学 ②自己免疫疾患 ③NKT細胞 ④サイトカイン ⑤レチノイン酸

1. 研究開始当初の背景

ナチュラルキラーT細胞（以下NKT細胞）は、 α/β のヘテロ2量体からなるT細胞受容体（以下TCR）とともに、種々のNK細胞抗原を発現するユニークなT細胞集団である。NKT細胞の大部分は、マウスではV α 14-J α 15、ヒトではV α 24-J α 15からなる均一な α 鎖のTCRを有する細胞集団で、これらは特にインバリアントNKT（iNKT）細胞と呼ばれる。多様性を欠く結果、iNKT細胞の頻度は、抗原特異的T細胞の頻度と比べてはるかに多いのが特徴である。NKT細胞は、MHC様分子のCD1d上に提示された糖脂質抗原を認識する。CD1d

分子も通常のMHC分子のような多様性がないため、全てのiNKT細胞はCD1d上の糖脂質抗原を一様に認識する。代表的なiNKT細胞抗原である α ガラクトシルセラミド（以下 α GalCer）は海綿由来の糖脂質分子で、その強力なNKT細胞活性化能はNKT細胞研究に欠かせないツールとなっている。抗原刺激を受けたiNKT細胞は、IL-4とIFN- γ をはじめとする種々のサイトカインすみやかに大量に産生する。IFN- γ は主にTh1反応を誘導し自己免疫疾患発症に関わる一方、IL-4は主にTh2反応を誘導しアレルギー反応に関わる。過剰なTh1自己応答である自己免疫疾患の

新規治療法の開発を目的として、マウス実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) に対して治療効果を有する α GalCer 誘導体のスクリーニングをおこない、 α GalCer のスフィンゴシン鎖を短縮した誘導体 OCH が、NKT 細胞に選択的な IL-4 の産生を誘導して EAE を抑制することを見いだした。OCH はコラーゲン誘導性関節炎 (CIA) モデル、NOD マウスを用いた I 型糖尿病モデルなど他の自己免疫疾患モデルにおいて顕著な病態改善および治療効果を有することを示し、OCH による NKT 細胞を介した自己免疫疾患新規治療法の可能性を提唱した。一方マウスアレルギー性気道炎症モデルにおいて、IFN- γ 産生を選択的に誘導することで病態抑制効果を発揮する新規合成糖脂質リガンド SGL は、気道肺胞洗浄液中の好酸球集積と Th2 サイトカイン産生を顕著に抑制し、肺組織へのリンパ球浸潤と胚細胞の過形成を強く抑えることにより著しい気道炎症抑制効果を示した。NKT 細胞を介した免疫療法は Th1 制御のみならず Th2 制御にも有効であることが明らかとなった。

以上の結果から、NKT 細胞を介した種々の免疫疾患への介入が可能であることが明らかとなった。

2. 研究の目的

上にもまとめたように、種々の免疫疾患は、生体の Th1/Th2 バランスの破綻の程度により、よりその発症が規定されると信じられてきたが、特に自己免疫疾患との関連において、最近の研究から新たな細胞集団として IL-17 産生性 T 細胞 (Th17 細胞) が同定され、Th17 細胞およびその産生する IL-17 が自己免疫病態形成と密接に関連することが示された。しかしながら、本件体会し当初においては、IL-17 に代表される新たなサイトカイン群と iNKT 細胞との関連については、ほとんど明らかにされて居らず、不明な点が多々残されていた。よってまず既存の合成糖脂質抗原が、NKT 細胞の IL-17 産生に与える影響を検証した。予想に反して、糖脂質抗原で活性化した NKT 細胞は、大量の IL-17 を産生する細胞であることが明らかとなり、糖脂質抗原の種類による産生レベルの違いは、見出すことができなかった。そこで、NKT 細胞が産生する IL-17 が自己免疫疾患の増悪因子として働く可能性を想定し、活性化 NKT 細胞からの IL-17 産生の効果的な制御法の確立を目的とした。得られた成果に基づいて、新規自己免疫疾患治療法の手がかりを得ることを目指し、研究を進めた。

3. 研究の方法

C57BL/6 マウスに各種合成糖脂質抗原を投与することにより、血清中の IL-17 産生の変動を定量解析した。サイトカイン産生量の定

量は、サンドイッチ ELISA 法を用いて行い、必要に応じて Cytometric Beads Array (CBA) 法、および定量 PCR 法を適宜併用した。

B6 マウス由来脾臓細胞を各種合成糖脂質抗原存在下で培養し、培養液中の IL-17 濃度の変動を定量解析した。

B6 マウス由来脾臓細胞より分離した T 細胞を、種々の合成レチノイド (10nM-1 μ M) 存在下に抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、培養上清中の IL-17 を測定した。さらに脾臓 T 細胞を Th17 細胞誘導条件下 (IL-6; 20ng/ml) /TGF- β ; 5ng/ml) で合成レチノイドを添加して抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、抗 CD3 抗体にて再試激した後の Th17 細胞分化を、IL-17 産生能を比較した。

培養後の細胞から RNA を抽出し、cDNA 合成後に定量 PCR 法を用いて、Th17 細胞分化のマスター遺伝子である ROR γ t の発現を比較した。B6 マウスに MOG35-55 ペプチドを免疫後、百日咳毒素 (PT) を腹腔内投与することで実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導した。CMC に懸濁した各種合成レチノイドの経口投与による EAE 発症抑制効果を比較した。

4. 研究成果

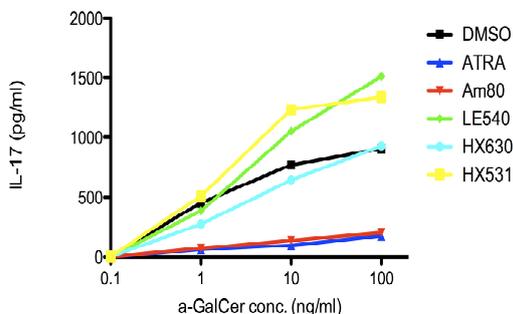
(1) 糖脂質による IL-17 産生の変動解析

B6 マウスに合成糖脂質抗原 α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer) を投与することにより、血清中の IL-17 が速やかに産生された。B6 マウス由来脾臓細胞を、 α -GalCer 存在下で 72 時間-96 時間培養すると、培養上清中に IL-17 の産生が認められた。他の合成糖脂質についても同様の検討を行ったが、いずれも IL-17 産生が認められ、調べた限りでは選択的に IL-17 産生を誘導しない糖脂質は見出すことができなかった。よって、種々の合成糖脂質を用いて、選択的に IL-17 産生の促進あるいは抑制という当初の計画に見合う合成糖脂質は得られなかった。同時期に NKT 細胞が非常に良い IL-17 の産生細胞であることを示した論文が発表されたため、以後は糖脂質抗原による活性化した NKT 細胞からの IL-17 産生を制御する方法の探索に向けて、研究を進めることとした。

(2) NKT 細胞由来 IL-17 産生制御因子としてのレチノイドの解析

糖脂質抗原刺激により活性化した NKT 細胞自身が相当量の IL-17 を産生することが明らかとなったため、この活性化 NKT 細胞からの IL-17 産生を制御する新しい方法の探索に着手した。生体内における Th17 細胞の IL-17 産生制御メカニズムに関して、レチノイン酸による制御の重要性が報告されたため、天然型レチノイン酸 (all-trans retinoic acid; ATRA) を含めた種々のレチノイドを用意し、NKT 細胞からの IL-17 産生に対する効果を解析した。 α GalCer 刺激した iNKT 細胞の IL-17

産生に対するレチノイドの効果を調べたところ、ATRAをはじめとするRARアゴニストは抑制的に作用し、IL-17産生を減少させた。一方、RARアンタゴニストLE540は、糖脂質刺激後のIL-17産生を増強した(図)。



レチノイン酸受容体(RAR)はホモ二量体を形成してATRAをはじめとする種々のレチノイドを結合するが、RARはレチノイドX受容体(RXR)とテロダイマーを形成することもできるため、RXRリガンドの効果についても解析をすすめる必要があると考えた。そこで同様に種々のRXRリガンドを用意し、NKT細胞からのIL-17産生に対する効果を調べたところ、複数のRXRアゴニストにNKT細胞からのIL-17産生を修飾する活性が認められた。このことはRXRを介したシグナルがIL-17産生亢進作用を有する可能性を示している。このときRARとRXRの間にどのような相互作用が存在するかは明らかではないが、これら2種のレチノイド受容体が、NKT細胞からのIL-17産生にそれぞれ相反する作用を引き起こすことが明らかとなった。

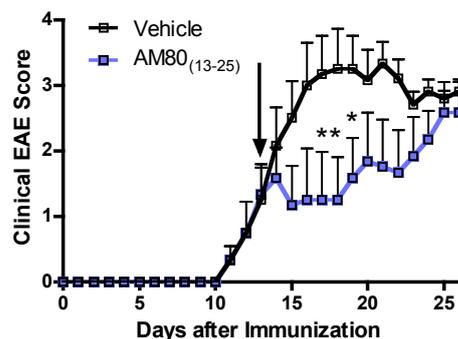
(3) IL-17産生制御因子としてのレチノイドの機能解析

活性化NKT細胞からのIL-17産生は、ナイーブT細胞および分化したTh17細胞からのIL-17産生と同様、ATRAなどのレチノイドの存在下で、有意に抑制された。したがってIL-17産生制御という観点からは、NKT細胞とT細胞に対するレチノイドの作用メカニズムは共通であると考え、以下T細胞を用いてさらなる解析をすすめた。T細胞からの有意なIL-17産生抑制には、比較的大量のATRAが必要であることから、将来的にレチノイドによる自己免疫疾患の制御を目指すことを考えて、より力価の強い合成レチノイドを用いることとし、すでに急性骨髄性白血病治療薬として臨床応用されている合成レチノイド、タミバロテンの有効成分であるAm80を用いて以下の解析をすすめた。ナイーブT細胞をIL-6/TGF- β 存在下で培養することにより得られるTh17細胞への分化に対して、ATRA

とAm80はいずれも抑制的に作用し、IL-17産生およびTh17細胞のマーカー遺伝子であるROR γ tの発現を減少させた。また分化したTh17細胞に対しても、ATRAとAm80は抑制的に作用し、IL-17産生を減少させた。この時、Am80の作用はATRAに比べて10倍以上強いことが明らかとなり、Am80が有効なIL-17産生制御薬となることが明らかとなった。よって、レチノイドによるIL-17産生制御が得られたことから、次にこのレチノイドAm80による自己免疫病態の制御が可能であるかどうかを検討した。

(3) 自己免疫病態制御因子としてのレチノイドの機能解析

自己免疫病態制御因子としての合成レチノイドの可能性を探るため、EAE誘導時(抗原免疫時)より3mg/kgの用量でAm80を経口投与した結果、EAEに対する病態改善効果が得られた。このときEAE発症マウスのCNS浸潤T細胞のIL-17産生とROR γ t発現は、Am80投与により有意に減少したが、Foxp3の発現増加は認められなかった。さらにEAEの臨床症状が出現してからAm80の投与を開始する治療的プロトコールでも、EAEに対する病態改善効果が得られた(図)。



Am80の投与後、EAE発症マウスのCNS浸潤細胞におけるIL-17産生とROR γ t発現は、観察期間中を通じて抑制状態が維持されていたにも関わらず、EAE後期ではAm80の治療効果が減弱する傾向が認められた。このときAm80の投与群では、CNS浸潤細胞のIL-10産生が有意に抑制されていることが明らかとなった。一連の解析により、Am80はROR γ t/Foxp3が両陽性のユニークなT細胞集団からのIL-10産生を抑制することが明らかとなり、継続投与によるAm80の効果の消失に、この選択的なIL-10産生抑制が関わる可能性が考えられた。以上の結果より、合成レチノイドAm80やATRAをはじめとする種々のRARアゴニストは、NKT細胞及びT細胞に働きかけて、炎症性サイトカインIL-17の産生を抑制し、IL-17依存性の病態を改善する効果があることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

1) Invariant NKT cells Biased for IL-5 Production Act as Crucial Regulators of Inflammation.

Kaori Sakuishi, Shinji Oki, Manabu Araki, Steven A. Porcelli, Sachiko Miyake, Takashi Yamamura

J. Immunol. 179, 3452-3462 (2007) (査読あり)

2) Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines

Yoshimitsu Doi, Shinji Oki, Tomoko Ozawa, Hirohiko Hohjoh, Sachiko Miyake, and Takashi Yamamura

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 8381-8386 (2008) (査読あり)

3) NKT cell-dependent amelioration of a mouse model of multiple sclerosis by altering gut flora

Hiroaki Yokote, Sachiko Miyake, J. Ludovic Croxford, Shinji Oki, Hidehiro Mizusawa, and Takashi Yamamura

Am. J. Pathol. 173, 1714-1723 (2008) (査読あり)

4) Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates EAE

Christian Klemann, Benjamin JE Raveney, Anna K Klemann, Tomoko Ozawa, Stephan von Hörsten, Koichi Shudo, Shinji Oki, Takashi Yamamura

Am. J. Pathol. 印刷中 (査読あり)

5) Retinoid signals and Th17-mediated pathology

Christian Klemann, Benjamin JE Raveney, Shinji Oki and Takashi Yamamura

日本臨床免疫学会会誌 32 巻 1 号, 20-28 (2009) (査読なし)

6) Identification of a possible therapeutic target through pathogenic T cell analysis of multiple sclerosis

Shinji Oki and Takashi Yamamura

日本臨床免疫学会会誌 印刷中 (2009) (査読なし)

[学会発表] (計21件)

[国際学会]

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

2007

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

3) Toru Yago, Ryosuke Tajima, Shinjiro Kaieda, Shinji Oki, Takashi Yamamura, Sachiko Miyake: MR1-restricted Vα19i T cells ameliorate murine models of arthritis. 2007 Annual Scientific Meeting of ACR, Boston, Nov. 6th-11th, 2007

4) Shinji Oki, Yoshimitsu Doi, Tomoko Ozawa, Sachiko Miyake, Takashi Yamamura: Functional involvement of NR4A2 in the pathogenesis of inflammatory demyelinating disease. Keystone Symposia 2008: Nuclear Receptors: Orphan Brothers (Z1), Whistler CA, Apr. 1st, 2008

5) Christian Klemann, Shinji Oki, Anna K Klemann, Tomoko Ozawa, Yoshimitsu Doi, Koichi Shudo, Takashi Yamamura: Synthetic Retinoid Am80 ameliorates EAE by attenuating Th17-mediated inflammation. The 9th International Congress of Neuroimmunology, Fort Worth, Oct. 26th, 2008

[国内学会]

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

2) 田島良亮、海江田信二郎、大木伸司、三宅幸子: 抗体誘導関節炎におけるNKT細胞の機能解析 第51回日本リウマチ学会総会・学術集会・第16回国際リウマチシンポジウム 2007年4月27日(横浜)

3) 海江田信二郎、田島良亮、大木伸司、坂口志文、三宅幸子: SKGマウスにおける結核死菌投与による関節炎の誘導 第51回日本リウマチ学会総会・学術集会・第16回国際リウマチシンポジウム 2007年4月27日(横浜)

4) Yoshimitsu Doi, Shinji Oki, Sachiko Miyake, Takashi Yamamura: Functional Involvement of NR4A2 in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis 第20回内藤コンファレンス 2007年10月9日(葉山、神奈川)

5) 土居芳充、大木伸司、三宅幸子、山村隆: 多発性硬化症における病原性T細胞のサイトカイン産生制御機構 第35回日本臨床免疫学会総会 2007年10月19日(大阪)

- 6) 横手裕明, J. Ludovic Croxford, 水澤英洋, 大木伸司, 三宅幸子, 山村隆: 実験的自己免疫性脳脊髄炎における腸内フローラの役割に関する検討 第 35 回日本臨床免疫学会総会 2007 年 10 月 19 日 (大阪)
- 7) 大木伸司, 市川大樹, 山村隆, 三宅幸子: プロテオミクスを用いたアナジーT 細胞内タンパク質の解析 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 2007 年 11 月 20 日 (東京)
- 8) 横手裕明, J. Ludovic Croxford, 水澤英洋, 大木伸司, 三宅幸子, 山村隆: 実験的自己免疫性脳脊髄炎における腸内フローラの役割に関する検討 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 2007 年 11 月 20 日 (東京)
- 9) 八子徹, 海江田信二郎, 大木伸司, 山村隆, 三宅幸子: MR1 拘束性 T 細胞によるマウス関節炎モデルの抑制 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 2007 年 11 月 20 日 (東京)
- 10) Christian Klemann, Shinji Oki, Tomoko Ozawa, Yoshimitsu Doi, & Takashi Yamamura: Alteration of Th17 differentiation by retinoic acid signals ameliorate EAE development 第 20 回日本神経免疫学会学術集会 2008 年 4 月 17 日 (新潟)
- 11) 八子徹, 田島良亮, 海江田信二郎, 大木伸司, 三宅幸子: MR1 拘束性 $V\alpha 19i T$ 細胞のコラーゲン誘導関節炎 (CIA) における機能解析 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会・第 17 回国際リウマチシンポジウム 2008 年 4 月 20 日 (札幌)
- 12) Christian Klemann, Shinji Oki, Anna K Klemann, Ben JE Raveney, Tomoko Ozawa, Koichi Shudo, Takashi Yamamura: Synthetic retinoid Am80 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by attenuating Th17-mediated inflammation 第 36 回日本臨床免疫学会総会 2008 年 10 月 17 日 (東京)
- 13) 大木伸司, Christian Klemann, Benjamin JE Raveney, Anna K Klemann, 小澤智子, 首藤紘一, 山村隆: 合成レチノイド Am80 の Th17 細胞分化制御を介した自己免疫応答抑制効果について 第 19 回日本レチノイド研究会 2008 年 11 月 21 日 (東京)
- 14) Shinji Oki, Yoshimitsu Doi, Benjamin JE Raveney, Tomoko Ozawa, Hirohiko Hohjoh, Sachiko Miyake, Takashi Yamamura: Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines (シンポジウム招待講演) 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 2008 年 12 月 1 日 (京都)
- 15) Christian Klemann, Shinji Oki, Benjamin J.E. Raveney, Takashi Yamamura: Synthetic Retinoid Am80 ameliorates EAE by attenuating Th17-mediated inflammation 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 2008

年 12 月 1 日 (京都)

- 16) 大木伸司, レイバニー・ベン, クレマン・クリスチャン, 首藤紘一, 山村隆: 実験的自己免疫性ブドウ膜炎 (EAU) に対する合成レチノイド Am80 の病態抑制効果 第 21 回日本神経免疫学会学術集会 2009 年 3 月 12 日 (新潟)

〔図書〕 (計 5 件)

- 1) 大木伸司: 改変糖脂質抗原による NKT 細胞を介した免疫制御 生化学 (日本生化学会編) 第 79 巻 357-362 (2007)
- 2) 大木伸司: サイトカインネットワークのパラダイムシフト Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology 第 1 巻 第 2 号 4-8, (2008)
- 3) 大木伸司, 山村隆: Topics/Review: 多発性硬化症の新しい治療戦略 HUMAN SCIENCE (ヒューマンサイエンス振興財団編) 第 19 巻 第 4 号 24-27, (2008)
- 4) 大木伸司: 生化学辞典 (第 4 版) 東京化学同人 項目執筆 (2008)
- 5) 大木伸司: 初めての国際学会と英語プレゼンテーション Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology 第 3 巻 第 2 号 50-52, (2009)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

(1) 発明の名称: IL-17 産生抑制物質及びそのスクリーニング方法

発明者: 大木伸司, 北條浩彦, 三宅幸子, 山村隆

出願日: 2008 年 2 月 28 日

出願人: (財) ヒューマンサイエンス振興財団

公開番号: 特開 2008-211985

出願国: 日本

(2) 発明の名称: IL-17 に起因する炎症を改善するための医薬組成物

発明者: 大木伸司, 北條浩彦, 三宅幸子, 山村隆

出願日: 2008 年 2 月 28 日

出願人: (財) ヒューマンサイエンス振興財団

国際公開番号: WO 2008/105498

出願国: PCT

○取得状況 (計 0 件)

特になし

〔その他〕

・NR4A2 の論文 (Doi et al. Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines. PNAS 105: 8381,

2008) が掲載されるにあたり、関連のニュースが共同通信から全国に配信された。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大木 伸司 (SHINJI OKI)

国立精神神経センター 神経研究所

疾病研究第六部 室長

研究者番号 50260328

(2) 研究分担者

山村 隆 (TAKASHI YAMAMURA)

国立精神神経センター 神経研究所

疾病研究第六部 部長

研究者番号 90231670

(3) 連携研究者

なし