

Sulfatide は樹状細胞による α -galactosylceramide の提示を阻害する

金森 光広

目次

要旨	2
序論	3
材料と方法	8
結果	14
考察	34
謝辞	39
参考論文	40

要旨

Sulfatide は中枢神経系のミエリン鞘を構成する主要な糖脂質である。その他、腎臓、膵臓や腸管に多く存在し、多発性硬化症や I 型糖尿病、癌転移等への関与が示唆されている。 α -galactosylceramide (α GC) は CD1d 拘束性のナチュラルキラー T (NKT) 細胞のうち、均一な TCR α 鎖を発現するインバリアント NKT (iNKT) 細胞を活性化することがよく知られているのに対し、CD1d 上に提示された sulfatide は iNKT 細胞以外の NKT 細胞 (non-iNKT 細胞) の少なくとも一部を活性化することが報告されており、この sulfatide 応答性の non-iNKT 細胞が iNKT 細胞により誘導される免疫応答を抑制することがいくつかのマウスモデルから示唆されている。しかし、*in vitro* で non-iNKT 細胞の sulfatide への応答を調べた研究は少なく、特に精製した sulfatide 応答性の non-iNKT 細胞の機能解析は行われていないため、sulfatide が iNKT 細胞依存的な生体応答をどのように制御しているのかは明らかではない。加えて、主要な抗原提示細胞である樹状細胞 (DC) による iNKT 細胞活性化における sulfatide の影響も十分には検討されてこなかった。これらを踏まえ、本研究では DC を抗原提示細胞とした iNKT 細胞による免疫応答に対する sulfatide の作用を解析した。

精製した iNKT 細胞と DC を α GC 存在下で培養した際の iNKT 細胞によるサイトカイン産生は、sulfatide を添加することで低下したため、sulfatide は non-iNKT 細胞を介さずに iNKT 細胞の活性化を阻害すると考えられた。しかし、sulfatide は DC による α GC の取り込みや DC 自身の成熟には影響しなかった。 α GC と sulfatide は共に CD1d を介して提示されるため、sulfatide が α GC の CD1d への結合を阻害している可能性を検討したところ、 α GC 存在下で培養した際の DC の細胞表面における α GC を結合した CD1d (α GC/CD1d) の提示量は sulfatide を添加することで低下した。また、プレートに CD1d-Ig 分子を固着化したところに α GC を添加することで形成される α GC/CD1d の量も sulfatide により低下した。このような α GC/CD1d 複合体形成の阻害は、iNKT 細胞活性化によるサイトカイン産生の低下としても検出された。マウス生体に α GC を投与した際の脾臓 DC 上の α GC/CD1d 複合体量も、 α GC と同時に sulfatide を投与した群では低下し、 α GC により誘導される血清中の IFN- γ や IL-12p70 の濃度も低下した。さらに α GC/CD1d を認識して iNKT 細胞が活性化すると上昇することが知られる CD40L の発現レベルも sulfatide により抑制された。

以上の結果から、sulfatide は DC の CD1d を介した α GC の提示を阻害することにより iNKT 細胞の活性化を阻害していることが明らかとなった。

序論

Sulfatide (3'-sulfogalactosylceramide) は、セラミド骨格に sulfogalactose が付加された糖脂質であり、中枢神経系のミエリン鞘の主要な構成成分であるが、その他腎臓、膵臓および腸管等にも存在する[1-4]。Sulfatide 合成酵素である cerebroside sulfotransferase (CST)を欠損するマウスでは軸索の傍絞輪部ジャンクション形成に異常がみられ、これらのマウスは進行性失調症を示す[5]。一方、神経系の細胞のリソソームへの過剰な sulfatide の蓄積は致死性の異染性白質ジストロフィーを誘導する[6]。またこの糖脂質はいくつかの免疫疾患との関係が示唆されている。例えば、I型糖尿病の患者の中には血清中に sulfatide に対する抗体を持つものが多く[7, 8]、多発性硬化症への sulfatide の関与も示唆されている[9]。また血清中の sulfatide 濃度は頸動脈内膜中膜厚と正の相関を持つことから動脈硬化症の進行の指標となる可能性が示唆されている[10]。加えて sulfatide は、ヒト由来乳癌細胞株[11]、マウス由来大腸癌細胞株[12]、ヒト肺腺癌組織[13]、ヒト腎細胞癌組織および細胞株[14, 15]、ヒト卵巣癌組織[16]など多数の癌細胞/組織に発現しており、結腸直腸腺癌の転移への関与が示唆されている[17]。

脂質が免疫系に介入する機序の一つとして、抗原提示分子 CD1 を介した特異的 T 細胞の活性化が挙げられる。CD1 は多型性の無い MHC クラス I 分子様の膜タンパク質であり、 β 2 ミクログロブリンと会合している。その配列から CD1a-c、CD1d、CD1e の三組に分類されており、ヒトにおいては五つ全ての CD1 分子が発現され得る。しかし、マウスにおいて発現が認められるのは CD1d のみである[18]。CD1d には、 α -galactosylceramide (α GC) と同じく sulfatide がセラミド部位の炭化水素鎖を介して結合することが明らかにされている[19, 20]。CD1d に結合して提示されたこれら脂質抗原を T 細胞受容体 (T cell receptor; TCR) を介して認識する細胞をナチュラルキラー T (Natural killer T; NKT) 細胞とよぶが、CD1d に結合した α GC はもっぱらインバリアント NKT (iNKT) 細胞により認識され、その活性化を誘導することがよく知られている[21, 22]。iNKT 細胞と称される理由は限られた TCR (インバリアント TCR) を発現することによる。インバリアント TCR とはすなわち、ヒトでは V α 24-J α Q、マウスでは V α 14-J α 18 の TCR α 鎖および、主にヒトでは V β 11、マウスでは V β 2、V β 7 あるいは V β 8.2 の TCR β 鎖から成る TCR であり(図 1)[23]、I 型 NKT 細胞とも称される。他方、iNKT 細胞以外の CD1d 拘束性の細胞である non-iNKT 細胞は II 型 NKT 細胞とも呼ばれ、その発現する TCR は iNKT 細胞に比べてより多様であるが、マウスにおいては

主に V α 3.2-J α 9 および V β 8 から成ると考えられている[24]。その後 2004 年に、non-iNKT 細胞の一部が sulfatide/CD1d を認識し活性化するが、iNKT 細胞は sulfatide/CD1d を認識しないことが報告された(図 1)[25]。さらに、この sulfatide 応答性の non-iNKT 細胞は、V α 3/V α 1-J α 7/J α 9 および V β 8.1/V β 3-J β 2.7 から成る TCR を発現する傾向にあることも示された[26]。しかしながら、生体内の non-iNKT 細胞を過不足無く標識する手法は確立されていないため、包括的かつ厳密な解析は困難なのが現状である。

Non-iNKT 細胞の免疫応答における作用に関しては幾つかの報告がある。例えば、non-iNKT 細胞の少なくとも一部は、癌の影響下で IL-13 を産生することにより Gr-1⁺CD11b⁺の抑制性の細胞の TGF- β 産生を誘導し、抗癌免疫応答を抑制している可能性も示されている[27, 28]。多発性硬化症の実験モデルである experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)を誘導したマウスや、I 型糖尿病モデルの NOD マウスに sulfatide を投与すると、CD1d 依存的にそれぞれ症状が緩和されたり、発症が遅れる現象が観察されており、sulfatide 応答性の non-iNKT 細胞の関与が示唆されている[25, 29]。さらに sulfatide を投与したマウスより調製した樹状細胞(Dendritic cell; DC)を移入したマウスでは EAE の発症が抑制されることが報告されている[30]。これらのモデルは共に抗原特異的 T 細胞を介する免疫応答であり、non-iNKT 細胞が抗原特異的 T 細胞の活性化に対して直接的あるいは間接的に抑制作用を及ぼしうることを意味するものである。

特に sulfatide 応答性の non-iNKT 細胞に関しては、iNKT 細胞により誘導される免疫応答を抑制するということがいくつかのマウスモデルで報告されている。例えば、sulfatide により活性化した non-iNKT 細胞は、iNKT 細胞の INF- γ 産生を抑制することにより、肝臓の虚血性再灌流傷害を緩和することが示されている[31]。また、iNKT 細胞依存性の concanavalin-A (ConA) による肝炎モデル[32]でも、sulfatide を認識した non-iNKT 細胞は IL-12 と MIP-2 を介して局所へ誘引された iNKT 細胞の不活化を介して肝炎の症状を和らげることが示唆されている。また、卵白アルブミン (OVA) によって誘導される喘息モデルでも iNKT 細胞依存性に気道炎症が惹起されるが[33]、sulfatide を認識する non-iNKT 細胞は iNKT 細胞の不活化することにより肺の炎症を抑制することが示されている[34]。さらに、 α GC により活性化された iNKT 細胞の抗癌免疫応答も、sulfatide 応答性の non-iNKT 細胞が抑制するという報告もある[35] (図 2：仮説①)。

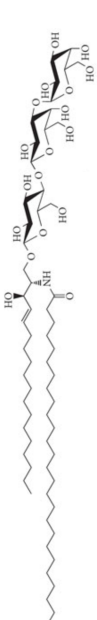
インバリアント TCR

ヒト：Vα24-JαQ および主に Vβ11

マウス：Vα14-Jα18 および主に Vβ2、7 あるいは 8.2



OCH



iNKT 細胞 non-iNKT 細胞

多様な TCR

マウス：主に Vα3.2-Jα9 および Vβ8

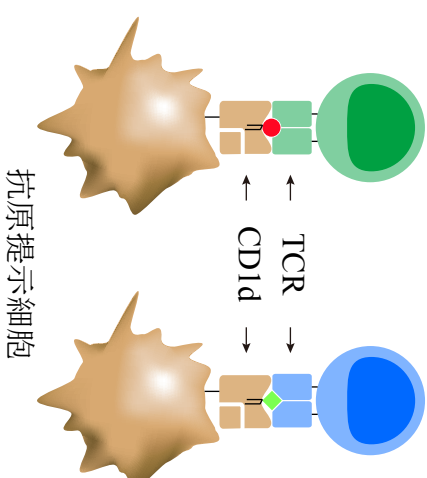
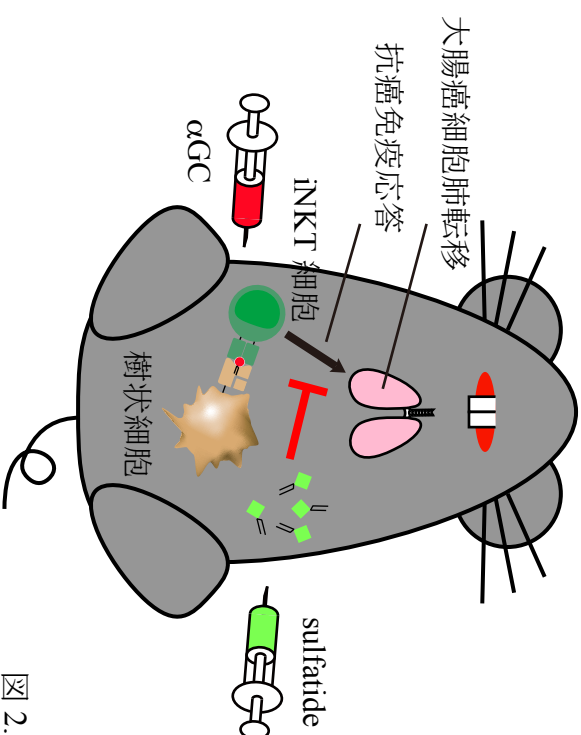
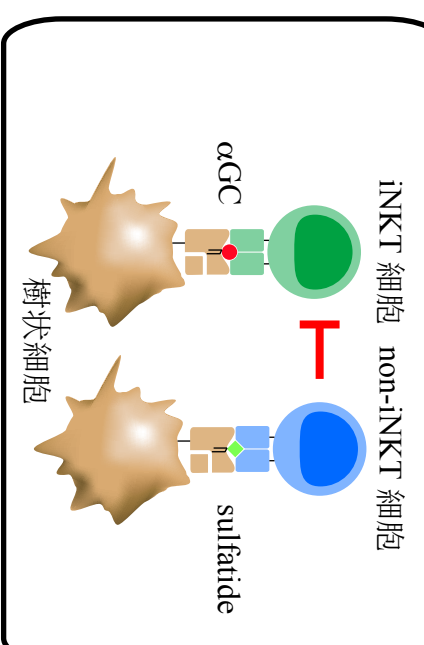


図 1. NKT 細胞サブセット及びそのリガンド

αGC により活性化した iNKT 細胞の抗癌免疫応答の
sulfatide 投与による抑制



仮説①：活性化 non-iNKT 細胞による抑制



仮説②：CD1d 上での競合阻害

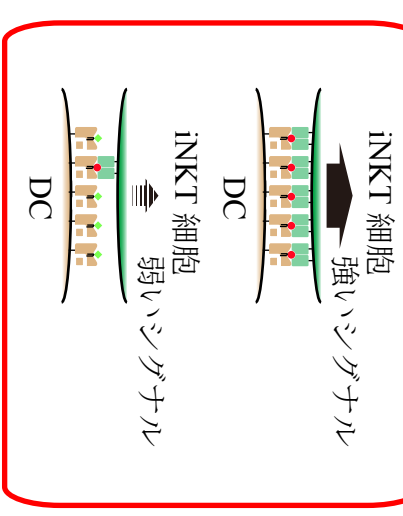


図 2. Sulfatide による iNKT 細胞の機能の阻害

一方 sulfatide は non-iNKT 細胞以外の血球系細胞に作用することも知られている。例えば、sulfatide は脳や脊髄に分布するグリア細胞やアストロサイトを活性化し、その TNF- α や IL-6、IL-12、IL-1 β などの炎症性サイトカインの産生を誘導することができる[36]。また、スカベンジャー受容体を介して sulfatide を発現するアポトーシス細胞を取り込んだマクロファージは TGF- β および IL-6 を産生することや[37]、マウスにおいて LPS 投与時の血清中の TNF- α の上昇を sulfatide が抑え、敗血症性ショックを抑制することが示されており[38]、さらに健常者由来の白血球を LPS あるいは PHA で刺激した際の IL-1 β 、IL-6、IL-8 産生は sulfatide 添加により低下する[39, 40]との報告もある。このため、sulfatide を投与した際の生体の応答の解釈は簡単ではない。事実、sulfatide 投与による EAE の症状緩和は、NKT 細胞を持たない CD1d 欠損マウスにおいても観察されており、したがって non-iNKT 細胞を介さない機序の存在が示唆されている[41]。Non-iNKT 細胞を生体より精製して *in vitro* で刺激し、その応答を検討した報告がこれまでにないことも考慮すると、上述した iNKT 細胞が引き起こす生体応答への sulfatide の抑制作用は、sulfatide/CD1d を認識した non-iNKT 細胞の機能によらない可能性も否定できない。

主要な抗原提示細胞である DC は CD1d を多量に発現しており[42]、 α GC を提示して iNKT 細胞を活性化することができる強力な作用を有することが知られる[43]。 α GC をマウスに投与すると、iNKT 細胞のみならず脾臓の DC も活性化される。この間の細胞間相互作用では、DC 上の α GC/CD1d をインバリアント TCR を介して iNKT 細胞が認識すると iNKT 細胞上の CD40L の発現が上昇し、これが DC 上の CD40 を介して DC を活性化してさらに CD40 の発現レベルを上昇させるだけでなく CD86 の発現を誘導する[44-47]。また、CD40 と CD40L の相互作用は DC の IL-12p70 の産生誘導に必須の過程でもある[47]。一方 α GC により活性化された iNKT 細胞は IL-12 の受容体をより強く発現し、DC が分泌する IL-12p70 のシグナルを受け取ってより多量の IFN- γ を産生するようになる[48]。このように DC は iNKT 細胞の活性化において重要な役割を持つが、DC の CD1d を介した抗原提示に sulfatide が及ぼす作用は研究されていない。 α GC も sulfatide もセラミド部位を介して CD1d に結合していることを考えれば、両者が CD1d 上で競合し、結果的に iNKT 細胞の活性化が阻害されていることも十分考えられる（図 2：仮説②）。 α GC はとりわけ、iNKT 細胞の活性化による抗腫瘍免疫応答の増強機能について注目されており[49]、前述したようにいくつかの腫瘍細胞は自ら sulfatide を産生する。したがって α GC により誘導される iNKT 細胞の活性

化を抑制する sulfatide の作用機序には興味を持たれる。

そこで申請者は、sulfatide が iNKT 細胞の機能を抑制する機序をより精査する目的で本研究を行った。その結果、DC 上での α GC の提示による iNKT 細胞の活性化が、non-iNKT 細胞の存在しない培養条件でも sulfatide により抑制されることが明らかとなった。さらに、sulfatide は *in vitro* と *in vivo* で DC 上の α GC/CD1d の複合体量を低下させることが判明し、合成した CD1d 分子への α GC の結合も阻害することが示された。以上の結果から、sulfatide は non-iNKT 細胞からの作用を介することなく、DC における α GC/CD1d 複合体形成を阻害することによりその iNKT 細胞への提示量を減少させ、結果として iNKT 細胞の活性化を阻害していることが明らかとなった。

材料と方法

マウス

C57BL/6 および BALB/c マウスは日本 SLC (浜松、日本)より購入した。J α 281 ノックアウトマウスは谷口克博士(理研 RCAI、横浜、日本)より、OT-II マウスは F. Carbone 博士(Melbourne 大学、Parkville、Victoria、Australia)より供与された。これらのマウスは specific pathogen free 環境下で飼育し、生後 6～13 週令で実験に用いた。すべての実験は本学の動物実験ガイドラインに従って行った。

抗体および試薬

抗 IL-2 (JES-1A12)、抗 IL-4 (11B11)、抗 IFN- γ (R4-6A2)、FITC 化抗 CD11c (N418)、PE 化 rat IgG2a, κ 、抗 CD8 α (Ly-2)、抗 Ly5.2 (104)、biotin 化 rat IgG2a, κ 、mouse IgG2a, κ 、抗 IL-2 (JES6-5H4)、抗 IL-4 (BVD6-24G2)、抗 IFN- γ (XMG1.2)、抗 CD1d (1B1)は eBioscience (San Diego, CA, USA)から、FITC 化抗 CD19 (1D3)、抗 β -TCR (H57-597)、PE 化 mouse IgG2a, κ 、抗 mouse IgG1 (A85-1)、抗 α GC/CD1d (L363)、抗 NK1.1 (PK136)、抗 CD1d (1B1)、biotin 化 rat IgG2b, κ 、armenian hamster IgG1, κ 、抗 CD40 (3/23)、抗 CD80 (16-10A7)、抗 CD86 (GL-1)、抗 H-2K^b (AF6-88.5)、抗 I-A^b (AF6-120.1)、抗 CD154 (MR1)の抗体は BD Biosciences (San Jose, CA, USA)から、PE 化抗 CD1d (1B1)抗体は BioLegend (San Diego, CA, USA)から購入した。

PerCP-Cy5.5 化 streptavidin、抗 CD4 IMAg-MSD、dimer XI (mouse CD1d:Ig)は BD Biosciences から、Alkaline phosphatase 化 streptavidin、Cy5 化 streptavidin は Jackson Immunoresearch Laboratory (West Grove, PA, USA)から、7-aminoactinomycin D、sheep 抗 rat IgG Dynabeads は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)から、抗 PE-、抗 FITC-、抗 CD11c-Microbeads は Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany)から、TOPRO-3 iodide は Molecular Probes (OR, USA)から購入した。

抗 CD8 α (53-6.72)、抗 MHC class II (M5/114.15.2)、抗 CD11b (M1/70)、抗 CD16/CD32 (2.4G2)、抗 CD45R (RA3-6B2.1)、抗 CD62L (Mel-14)、抗 Gr-1 (RB6-8C5)抗体および Granulocyte-Macrophage colony stimulating factor (GM-CSF: J558L)産生性ハイブリドーマは American Type Culture Collection (Manassas, VA、

USA)より購入しその培養上清を実験に使用した。

その他の試薬は以下の通りである。RPMI 1640 (ニッスイ：東京、日本)、streptomycin および penicillin (明治製菓：東京、日本)、fetal bovine serum (FCS、BioWHITTAKER：Lonza Walkersville, Inc. Walkersvi、MD、USA)、 α -galactosylceramide (α GC、KRN7000; キリン：東京、日本)、ウシの脳由来の sulfatide および半合成 sulfatide (lysosulfatide、palmitoyl sulfatide および tetracosanoyl sulfatide) (Matreya：Pleasant Gap、PA、USA)、Collagenase D (Roche：Barsel、Switzerland)、30 % BSA (大日本住友製薬：大阪、日本)、Percoll (American Pharmacia Biotec AB：Uppsala、Sweden)、para-nitro phenyl phosphatase (Sigma-Aldrich：St. Louis、MO、USA)、Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE、Molecular Probes (Invitrogen))、ovalbumin protein (生化学工業株式会社：東京、日本)。

Sulfatide は 0.5 % Tween 20 を含む 0.9 % NaCl 溶液に 50 mg/ml になるように溶かしたものを使用している。

細胞の調製方法

脾臓の DC は以下のように調製した。C57BL/6 マウスの脾臓を 400 U/ml の Collagenase D 溶液中で碎き、37°C で 45 分間インキュベートした。ピペットで攪拌して得られた細胞集団を遠沈後、30% BSA 溶液に懸濁し、RPMI 1640 を重層して遠心(2200rpm、30 分)することにより BSA と PRMI 溶液境界面の低密度細胞を回収した。抗体の Fc 受容体を介する非特異的吸着を防ぐため、氷上で 2.4G2 と 30 分間反応させた後、抗 CD11c-Microbeads を加えて氷上で 30 分間静置した。その後、MACS カラムで CD11c 陽性細胞を分離し、脾臓 DC として実験に用いた。

肝臓の DC は次のように調製した。C57BL/6 のマウスの肝臓を 400 U/ml の Collagenase D 溶液中でハサミを用いて細かく刻み、37°C で 45 分間インキュベートした。ピペットで攪拌して組織を崩して PBS で 2 回洗浄し、PBS に懸濁して低速遠心(700 rpm、1 分)にて分解できなかった組織片等を遠沈して上清を回収した。上清中の細胞を遠沈し、PBS で希釈した 40 % Percoll に懸濁して 70 % Percoll

に重層し、遠心(3000 rpm、20 分)した。40 %と 70 % Percoll の間に集積した細胞を回収してコットンで濾過し、脾臓 DC 調製時と同様に 2.4G2 処理後、抗 CD11c-Microbeads を用いて CD11c 陽性細胞を分離して、肝臓の DC として実験に使用した。

NKT 細胞は以下のように調製した。C57BL/6 マウスの脾臓をステンレスメッシュ上で破碎し、ACK buffer (0.15 M NH₄Cl、0.01 M KHCO₃、0.01 mM EDTA)で赤血球を溶血除去後、白血球細胞を CD8、MHC class II、CD11b、CD16/CD32、CD45R および CD62L に対する抗体と共に RPMI 1640 に懸濁して、攪拌しながら 4°C で 90 分間反応させた。細胞を RPMI 1640 で洗浄した後、攪拌しながら Sheep 抗 rat IgG Dynabeads と 4°C で 1 時間反応させた。磁石を用いて Dynabeads と結合した細胞を除去し、残った細胞を Dead Cell Removal Microbeads (Miltenyi Biotec) を含む溶液に懸濁し、常温で 15 分間静置した後、MACS カラムを用いて死細胞を除いた。得られた細胞を FITC 化抗 CD19 抗体および α GC/CD1d-IgG1 複合体と氷上で 1 時間反応させた。細胞を MACS buffer で洗浄して、PE 化抗 mouse IgG1 抗体と氷上で 1 時間反応させ、さらに MACS buffer で洗浄後、抗 PE Microbeads と氷上で 30 分間反応させた。MACS カラムで PE- α GC/CD1d 陽性細胞を濃縮した。この細胞をナイロンメッシュに通し、FACSVantage (Becton Dickinson Immunocytometry & Cellular Imaging, CA, USA)を用いて PE⁺FITC⁺の細胞を精製し、iNKT 細胞として使用した。一部の実験では、死細胞除去後に細胞を FITC 化抗 β -TCR 抗体および PE 化抗 NK1.1 抗体と氷上で 1 時間反応させた。MACS buffer で洗浄後、抗 PE Microbeads と氷上で 30 分間反応させ、MACS カラムで PE-NK1.1 陽性の細胞を濃縮した。この細胞をナイロンメッシュに通し、FACSVantage で FITC⁺PE⁺の細胞を精製し、NKT 細胞(iNKT 細胞および non-iNKT 細胞)として実験に用いた。

OT-II T 細胞は以下のように調製した。OT-II マウスの脾臓および体表リンパ節をステンレスメッシュ上で破碎し、ACK buffer で赤血球を除いた後、細胞を CD8、MHC class II、CD11b、CD16/CD32、CD45R および Gr-1 に対する抗体入りの RPMI 1640 に懸濁して、攪拌しながら 4°C で 90 分間反応させた。細胞を RPMI 1640 で洗浄した後、攪拌しながら Sheep 抗 rat IgG Dynabeads と 4°C で 1 時間反応させた。磁石を用いて Dynabeads と結合した細胞を除去し、残った細胞を抗 CD4 IMag-MSC と氷上で 30 分間反応させ、MACS カラムで CD4 陽性細胞を調製した。

細胞の培養

脾細胞は 5 % FCS、50 μ M 2-mercaptoethanol、100 U/ml penicillin および 100 μ g/ml streptomycin 入りの RPMI 1640 (以下 R5) に懸濁し、 8×10^5 cells/200 μ l/well で 96 穴平底プレートに播き、3 日間培養した。精製した NKT 細胞(β -TCR⁺NK1.1⁺) および iNKT 細胞は R5 に懸濁し同数の脾臓 DC とともに、 $1-2 \times 10^4$ cells/200 μ l/well で 96 穴丸底プレートに播いて 3 日間培養した。一部の実験では脾臓 DC を 100 ng/ml の α GC と様々な濃度の sulfatide 存在下で 19 時間培養した後に、洗浄して 1×10^4 個の DC を 1×10^4 個の iNKT 細胞と 3 日間共培養した。培養上清中のサイトカイン濃度は ELISA または Cytometric Bead Array (CBA) により測定した。

サイトカイン産生量の測定

ELISA 法では、抗 IL-4、抗 IFN- γ あるいは抗 IL-2 抗体を 0.1 M の NaHPO₄ 溶液 (pH 8.4) で 1 μ g/ml に希釈し、96 穴 ELISA 用プレート (Nalge Nunc International, New York, USA) に 50 μ l/well で入れ、一晩常温で静置して固層化した。3 % BSA 溶液を 150 μ l/well 加えて室温で 1 時間ブロッキングした後プレート洗浄し、段階希釈した標準サイトカインあるいは培養上清を 50 μ l/well 入れ、室温で 2 時間静置した。プレート洗浄後、0.5 μ g/ml の biotin 化抗 IL-4、抗 IFN- γ あるいは抗 IL-2 抗体をそれぞれ 50 μ l/well で加え、室温で 1 時間静置した。プレート洗浄後、0.125 μ g/ml の Alkaline phosphatase-conjugated streptavidin を入れ、室温で 30 分間静置した。プレート洗浄後、rapra-nitro phenyl phosphate で発色させ、VERSAMAX (Molecular Devices, CA, USA) を用いて 405 nm の吸光度を測定した。

Cytokine Beads Array (CBA) 法では、96 穴 V 字底プレートに CBA Mouse Inflammation Kit または CBA Mouse Th1/2/17 Kit (BD Biosciences) の各サイトカイン特異的ビーズと段階希釈した標準サイトカインあるいは培養上清 30 μ l とともに各サイトカインに特異的な PE 化抗体を加えて室温で 2 時間静置し、洗浄後、FACSCalibur で測定した。

DC の α GC に対するエンドサイトーシスへの sulfatide の影響の評価

脾臓 DC を 1×10^5 cells/well で 96 穴丸底プレートに播き、100 ng/ml の Cy5 標識 α GC または Cy5 および様々な濃度の sulfatide を添加して 37°C または氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を氷冷した PBS で洗浄し、細胞表面マーカーを染色して FACSCalibur で測定した。解析ソフト FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) を用いて蛍光標識強度 (mean fluorescence intensity: MFI) を算出した。各群の α GC の取り込み量は次のように算出した: {37°C 処理群の (Cy5- α GC の MFI) – 同じ条件下での (Cy5 の MFI)} – {氷上に静置した群の (Cy5- α GC の MFI) – 同じ条件下での (Cy5 の MFI)}。

DC 細胞表面に形成された α GC/CD1d 複合体数の計測

脾臓 DC を 1×10^5 cells/well で 96 穴丸底プレートに播き、100 ng/ml の α GC と様々な濃度の sulfatide を添加して 19 時間培養した。洗浄後、PE 化抗 α GC/CD1d または抗 CD1d 抗体と共に氷上で 1 時間静置・染色し、Phycoerythrin Fluorescence Quantitation Kit (QuantiBRITE™ PE : BD Biosciences) を用いてそれぞれの分子数を CellQuest ソフトウェアで算出した。

生体内での α GC/CD1d 形成量进行评估する場合は C57BL/6 マウスに vehicle (200 μ l の PBS)、4 μ g の α GC、30 μ g の sulfatide、または α GC と sulfatide の混合液を腹腔内投与した。4 時間後に脾臓の DC を調製して PE 化抗 α GC/CD1d または抗 CD1d 抗体で染色し、FACSCalibur で測定し、FlowJo で解析した。

無細胞系での α GC/CD1d の形成量の評価

96 穴 FIA ブラックプレート (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) に PBS (pH 7.4) あるいはリン酸クエン酸緩衝液 (pH 4.3~7.0) に 20 nM に希釈した biotin 化 dimer XI を 50 μ l/well で入れ、室温で 24 時間静置した。その後 α GC および sulfatide を蒸留水に終濃度がそれぞれ 132 nM および 330 あるいは 660 nM になるよう希釈して 1 μ l/well で直接加え、ピペティングにてよく攪拌して 37°C で 24 時間反応させた。150 μ l の 3 % BSA を添加して室温で 1 時間ブロッキングし、

プレートを経流水で洗浄してから PE 化抗 α GC/CD1d 抗体および Cy5-streptavidin を 50 μ l/well 加えて 2 時間室温で静置した。その後、プレートを蒸留水で洗浄し、プレートリーダーSPECTRAmax GEMINI EM (Molecular Devices、Sunnyvale, CA、USA)により蛍光強度を測定した。

生体への α GC、sulfatide 投与による作用の検討方法

C57BL/6 マウスに vehicle (200 μ l の PBS)、4 μ g の α GC、30 μ g の sulfatide を単独あるいは α GC と sulfatide の混合液を腹腔内投与して経時的に採血し、血清中のサイトカイン濃度を CBA Mouse Th1/2/17 Kit および CBA Mouse Inflammation Kit により測定した。また腹腔内投与 3 時間後に脾細胞を調製して PE 化抗 CD40 あるいは抗 CD86 抗体や biotin 化抗 CD154 抗体および Cy5-streptavidin で染色し、それぞれの iNKT 細胞における発現を FACSCalibur で測定した。

生体内での抗原特異的 T 細胞応答に対する sulfatide の作用の検討方法

OT-II マウスから調製した CD4 T 細胞を 1×10^7 cells/ml になるように RPMI 1640 で懸濁し、CFSE を加えて 37°C で 15 分間インキュベートした。標識した細胞を PBS で 3 回洗浄して PBS に懸濁し、J α 281 KO マウスの静脈に 2×10^6 cells/200 μ l で投与した。1 日後に vehicle (200 μ l の PBS)、30 μ g の OVA 蛋白、30 μ g の sulfatide を単独で、あるいは OVA と sulfatide の混合液をこれらのマウスに腹腔内投与し、その 3 日後に脾細胞を PE-Cy7 化抗 CD4 抗体および TOPRO-3 で染色して FACSCalibur で移入した T 細胞の増殖を測定した。

有意差検定法

実験結果は各群 3 検体の平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。有意差検定は Student's *t*-test 法を用い、*p* 値が 0.05 以下の場合を有意とした。全ての実験は少なくとも 2 回以上実施し、典型的なものを本稿に示した。

結果

iNKT 細胞の活性化に sulfatide が与える影響の検討

non-iNKT 細胞は抗腫瘍免疫応答に対して抑制的に作用することが報告されている[50]。また、sulfatide により活性化した non-iNKT 細胞は腫瘍免疫応答を抑制するが、 α GC により活性化した iNKT 細胞は亢進させることが示され、両者を同時に *in vitro* で刺激しても iNKT 細胞の応答が低下することが示されている[35]。

そこで iNKT 細胞および non-iNKT 細胞の両者と抗原提示細胞としての DC 含む脾細胞を用いて、 α GC により誘導されるサイトカイン産生に sulfatide が与える影響を調べた (図 3A)。C57BL/6 マウス (図 3B) と BALB/c マウス (図 3C) の両方の脾細胞を用いて検討したところ、iNKT 細胞による IL-2、IL-4、IFN- γ 産生量は添加した sulfatide の濃度依存的に低下した。しかし、sulfatide 単独では、調べたサイトカインについて有意な産生は認められなかったことから、sulfatide は non-iNKT 細胞の活性化を誘導せずに α GC に対する iNKT 細胞に何らかの作用を及ぼしていることが推測される。なお、BALB/c マウスは NK1.2 アロタイプであり、NKT 細胞の同定の一助とする抗 NK1.1 抗体が使用できないため、これ以降の実験では C57BL/6 マウスを使用することにした。

脾細胞中には NKT 細胞や DC 以外の細胞が含まれており、それらが sulfatide の作用に関与する可能性があるので、次に精製した NKT 細胞を用いて、同様の実験を行うこととした (図 4A)。脾臓より NKT 細胞を NK1.1⁺ β -TCR⁺細胞として精製した (図 4B、左図)。この細胞集団における iNKT 細胞と non-iNKT 細胞の構成比率はおよそ 1:1 であった (図 4B、右図)。精製した NK1.1⁺ β -TCR⁺細胞は α GC および sulfatide 存在下で抗原提示細胞の DC とともに培養した。iNKT 細胞の IL-2、IL-4、IFN- γ 産生量は脾細胞を用いた時と同様に sulfatide の濃度依存的に低下したが、sulfatide 単独ではサイトカイン産生は認められなかった (図 4C)。

ところが、脾臓から iNKT 細胞 (α GC/CD1d⁺) を精製し DC とともに培養した場合でも (図 5A)、 α GC により誘導される IL-2、IL-4、IFN- γ の産生量は sulfatide の濃度依存的に低下した (図 5B)。したがって、sulfatide は non-iNKT 細胞非存在下でも DC による α GC の提示を介した iNKT 細胞の活性化を阻害することが

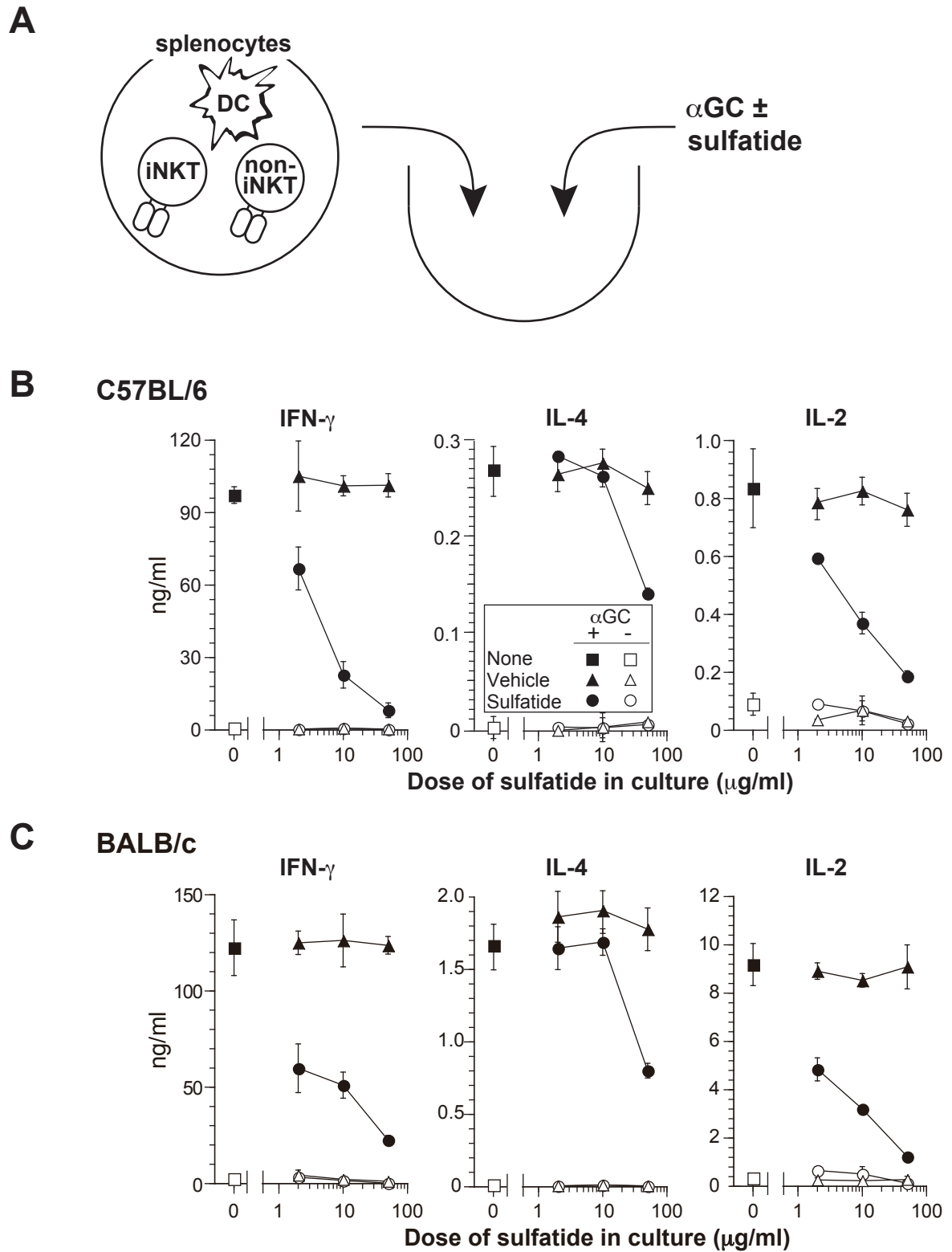


図 3. α GC 誘導性の脾細胞のサイトカイン産生に sulfatide が与える影響の検討

(A) 実験の概念図

C57BL/6 マウス (B) または BALB/c マウス (C) の脾細胞を 10 ng/ml の α GC および 2、10、50 μ g/ml の sulfatide あるいは相当量の vehicle (Tween 20) 存在下で 3 日間培養し、培養上清中の IFN- γ 、IL-4、IL-2 の濃度を ELISA にて測定した。

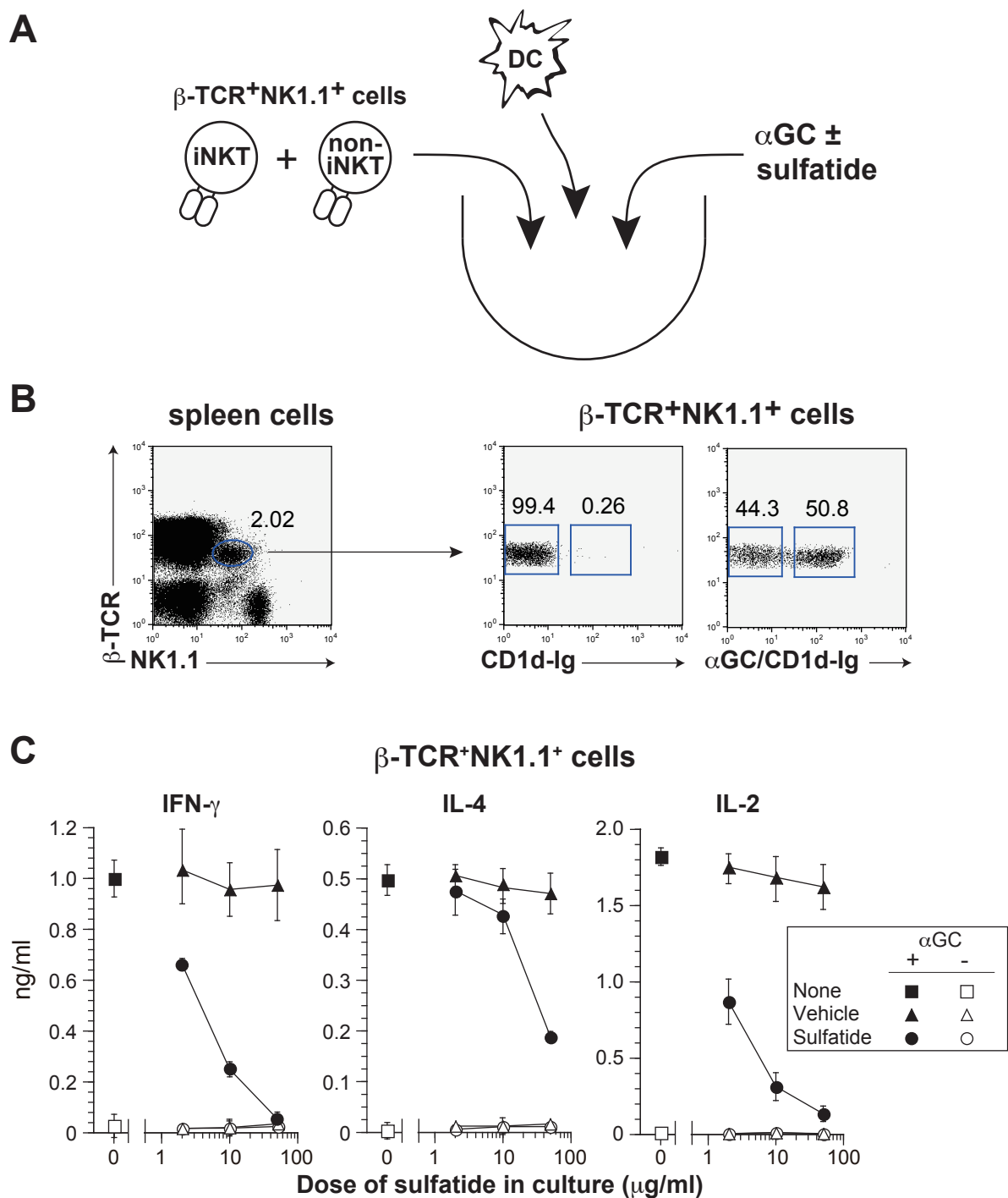


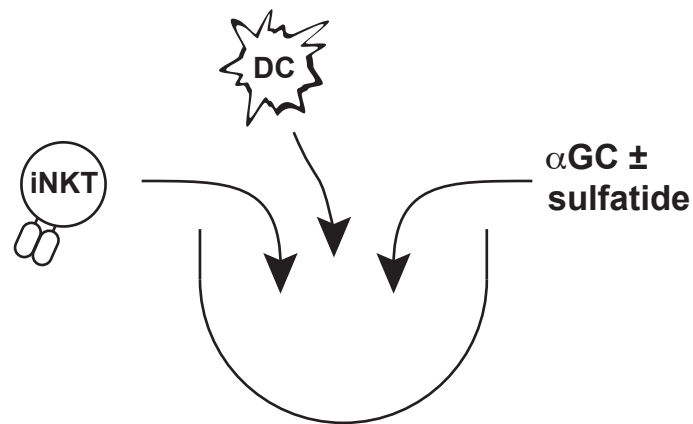
図 4. αGC 誘導性の NKT 細胞のサイトカイン産生に sulfatide が与える影響の検討

(A) 実験の概念図

(B) マウスの脾細胞を $\beta\text{-TCR}$ 、NK1.1 と $\alpha\text{GC}/\text{CD1d-Ig}$ 複合体あるいは対照として CD1d-Ig で染色し、flowcytometer で測定した。左のプロットは生細胞にゲートをかかけたもので、中央と右のプロットはさらに左のプロットに示すように $\beta\text{-TCR}^+\text{NK1.1}^+$ 細胞にゲートをかかけたものである。

(C) 精製した脾臓の NKT 細胞 ($\beta\text{-TCR}^+\text{NK1.1}^+$) を、脾臓の DC とともに、10 ng/ml の αGC および 2、10、50 $\mu\text{g/ml}$ の sulfatide あるいは相当量の vehicle (Tween 20) 存在下で 3 日間培養し、培養上清中の IFN- γ 、IL-4、IL-2 の濃度を ELISA にて測定した。

A



B

iNKT cells

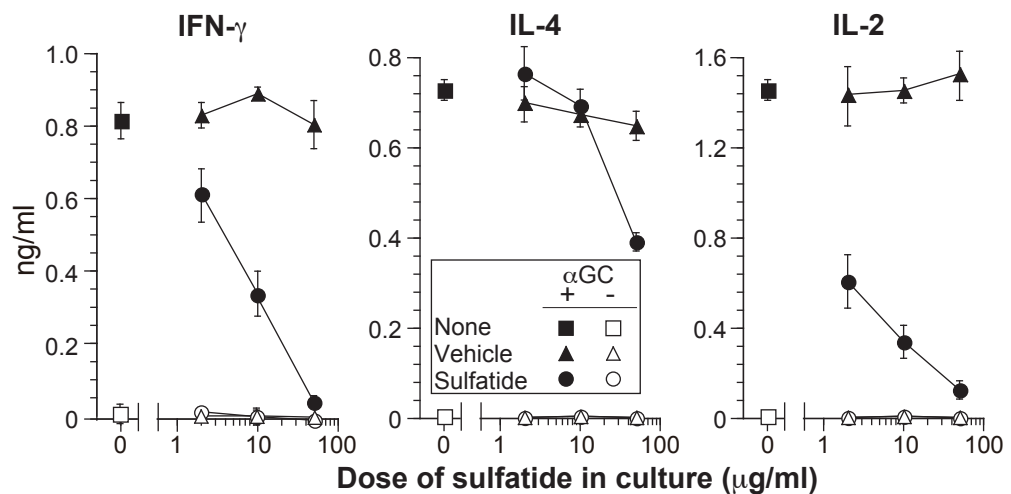


図 5. α GC 誘導性の iNKT 細胞のサイトカイン産生に sulfatide が与える影響の検討

(A) 実験の概念図

(B) 精製した脾臓の iNKT 細胞を、脾臓の DC とともに 10 ng/ml の α GC および 2、10、50 μ g/ml の sulfatide あるいは相当量の vehicle (Tween 20) 存在下で 3 日間培養し、培養上清中の IFN- γ 、IL-4、IL-2 の濃度を ELISA にて測定した。

明らかになった。

Sulfatide の DC による α GC に対する食作用と表現型に与える影響の検討

iNKT 細胞の応答は DC の抗原提示量や共刺激分子の発現レベルの影響を受けることが知られている。iNKT 細胞の TCR は CD1d に提示された sulfatide を認識しないことが示されているので[25]、sulfatide が DC の活性を低下させている可能性を検討することにした。まず、DC の α GC の取り込みに sulfatide が与える影響を検討した。 α GC は予め Cy5 で標識したものをを用い、sulfatide を同時に添加して DC の Cy5- α GC の蛍光強度を測定した。その結果、sulfatide は α GC の取り込みを阻害しなかった (図 6)。

以上図 3～6 の結果は本研究室修士課程修了者の田角裕介氏により示された結果 (「糖脂質 sulfatide が type I NKT 細胞の機能及び樹状細胞の成熟に与える作用の解析」(2010)) を申請者自身が追試したものである。

DC は培養することにより時間経過と共に成熟し、その抗原提示分子や共刺激分子の発現を増強することが知られている。そこで次に、これらの分子の発現上昇を sulfatide が阻害している可能性を検討した。sulfatide は DC を単独で培養した際の共刺激分子の発現レベルに影響せず、 α GC を提示するための CD1d 分子や MHC クラス I およびクラス II 分子の発現レベルが sulfatide によって低下することもなかった (図 7)。

DC における α GC/CD1d 複合体形成に sulfatide が与える影響の検討

α GC も sulfatide も CD1d と結合する糖脂質であるため、sulfatide が細胞表面や細胞内に取り込まれた後のエンドソーム／リソソーム系小胞内において競合的に α GC と CD1d の結合を阻害し、その結果 iNKT 細胞の活性化を阻害している可能性が考えられる。そこで、 α GC、sulfatide 存在下で脾臓 DC を培養し、細胞表面に提示される α GC/CD1d 分子を、それに特異的な抗体で染色して FACS で解析したところ、CD1d の蛍光強度には大きな影響は認められなかったが、予想通り DC が提示する α GC/CD1d の量は sulfatide の濃度依存的に低下した (図 8A)。発現されているこれらの分子をより定量的に計測するため、Quantitation Kit を用いて検討した。その結果、 α GC を結合する CD1d 分子数は CD1d 全体のおよそ

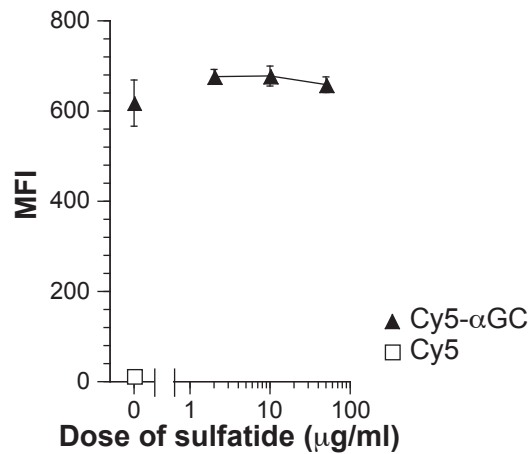


図 6. DC の α GC の取り込みに sulfatide が与える影響の検討

脾臓の DC に 100 ng/ml の Cy5- α GC または Cy5 を加え、37°C のインキュベーター内あるいは氷上で 1 時間培養した。その後、CD11c を染色し、flowcytometer で取り込まれた Cy5 の量を測定した。図は CD11c 陽性細胞の Cy5 の蛍光強度を示しており、37°C で培養した群の値から氷上で培養した群の値を控除したものを示している。

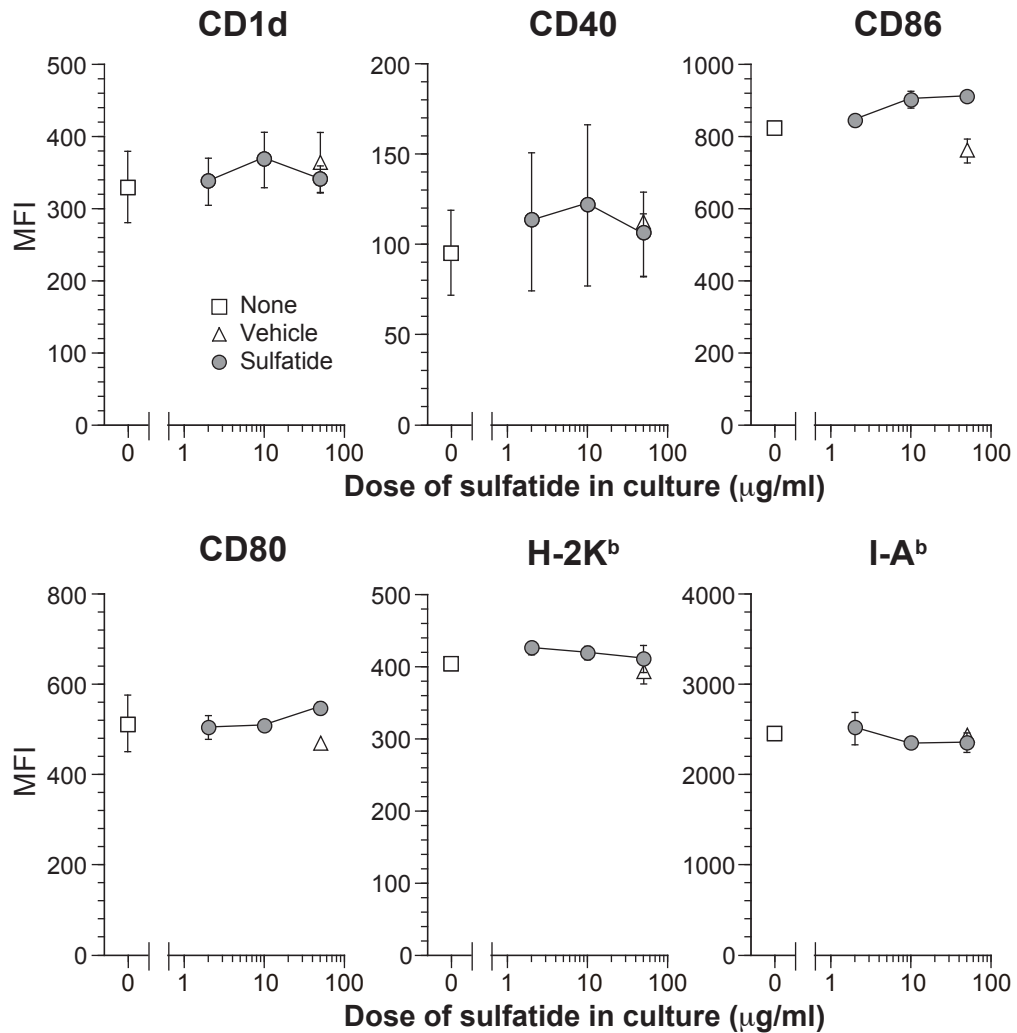


図 7. DC の表現型に sulfatide が与える影響の検討

脾臓の DC を 2、10、50 µg/ml の sulfatide あるいは vehicle 存在下で 24 時間培養し、CD11c および CD1d、CD40、CD80、CD86、H-2K^b、I-A^b 分子を染色して flowcytometer で測定した。図は CD11c 陽性細胞にゲートをかけたものを示している。

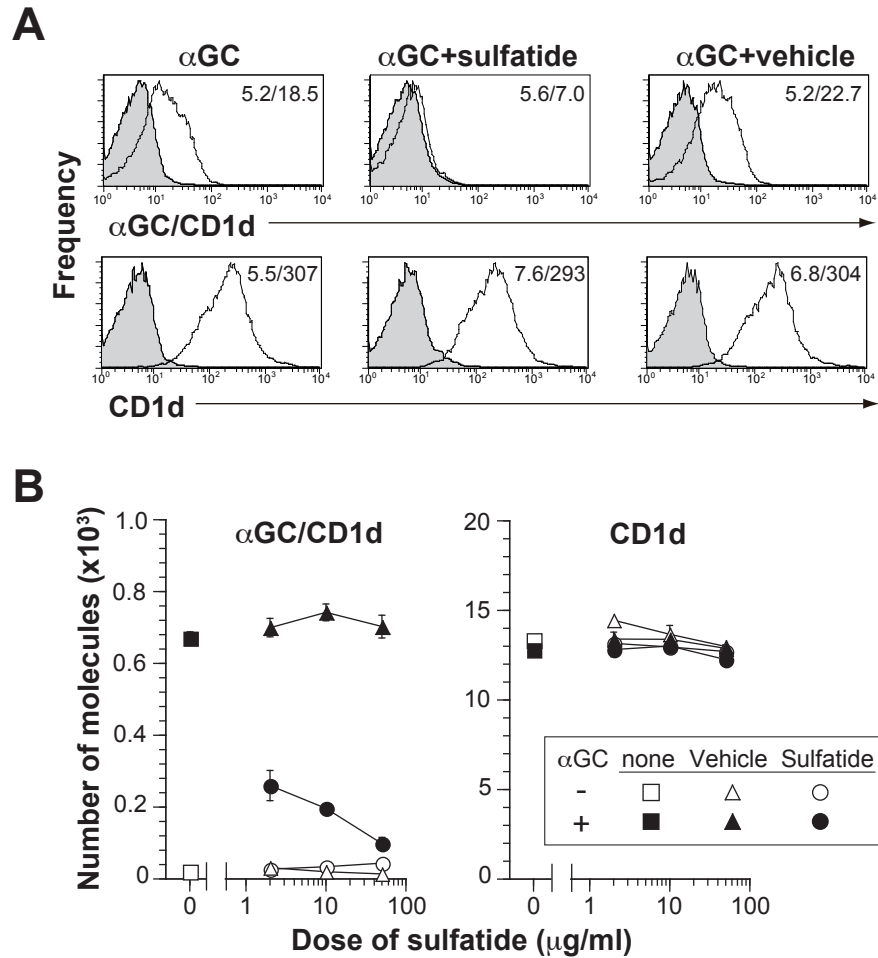


図 8. DC の α GC/CD1d の提示に sulfatid が与える影響の検討

脾臓の DC を 100 ng/ml の α GC および 2、10、50 μ g/ml の sulfatide または相当量の vehicle 存在下で 19 時間培養し、細胞表面の α GC/CD1d あるいは CD1d を染色して flowcytometer で測定した。ヒストグラム (A) は CD11c 陽性細胞の各分子の発現レベルを示している。また下段のグラフ (B) は、QuantiBRITE PE を用いて定量化した CD11c 陽性細胞上の α GC/CD1d および CD1d の分子数を示している。

5 %であった。またここに 20 倍量の sulfatide を添加すると、その値が 1/3 に低下し、さらに sulfatide を増量することにより濃度依存的に低下した (図 8B、左図)。しかし、図 7 の結果と一致して、このときの DC 上の CD1d の分子数は sulfatide の影響を受けなかった (図 8B、右図)。

このような現象を細胞応答として検出するため、予め α GC と sulfatide 存在下で培養した DC を抗原提示細胞として用いることにし、iNKT 細胞と共培養を行った (図 9A)。すると、iNKT 細胞の IFN- γ 産生量は、DC パルス時に添加した sulfatide の濃度に依存して低下することが示された (図 9B)。したがって、図 3 ~5 で観察された α GCにより誘導される iNKT 細胞のサイトカイン産生量の低下は、sulfatide による DC の α GC/CD1d 提示量低下に起因すると考えられる。

CD1d 分子への α GC の結合に sulfatide が与える影響の検討

α GC の CD1d への結合はエンドソームで効率よく行われることが知られるが [51-53]、ごく一部はペプチド抗原の MHC 分子を介する提示の場合のように細胞表面でも起こることが明らかである [54]。そこで、sulfatide による α GC と CD1d の結合の阻害を、CD1d-Ig 分子を用いて cell-free の条件下で調べることにした。

Biotin 化した CD1d 分子をプレートに固層化し、特異的抗体を用いて、様々な pH の緩衝液中で α GC を加えて α GC/CD1d 分子の形成量を検討した (図 10A)。その結果、pH 5.2 の場合にもっとも効率よく複合体が形成されることが分かった (図 10B)。しかも、中性でも pH 5.2 の条件でも、 α GC/CD1d の形成量は、 α GC と同時に sulfatide を添加することで阻害された (図 10C)。なお、プレートに固層化される CD1d 分子の量を Cy5-streptavidin で検出したところ sulfatide や溶液の pH に依らず一定量が固着していることが確認された (図 10D)。

α GC/CD1d 複合体形成量と iNKT 細胞応答との相関を調べるため、抗 CD28 抗体による補助刺激存在下で図 10 のように形成した固層化 α GC/CD1d-Ig により iNKT 細胞を刺激して、産生されたサイトカイン量を測定した (図 11)。対照群に比した応答性を算出した結果、 α GC/CD1d 複合体形成時に sulfatide が共存していた場合は、sulfatide 添加なしの場合に比べて iNKT 細胞の産生するサイトカインの量は sulfatide の量依存的に減少することが示された。

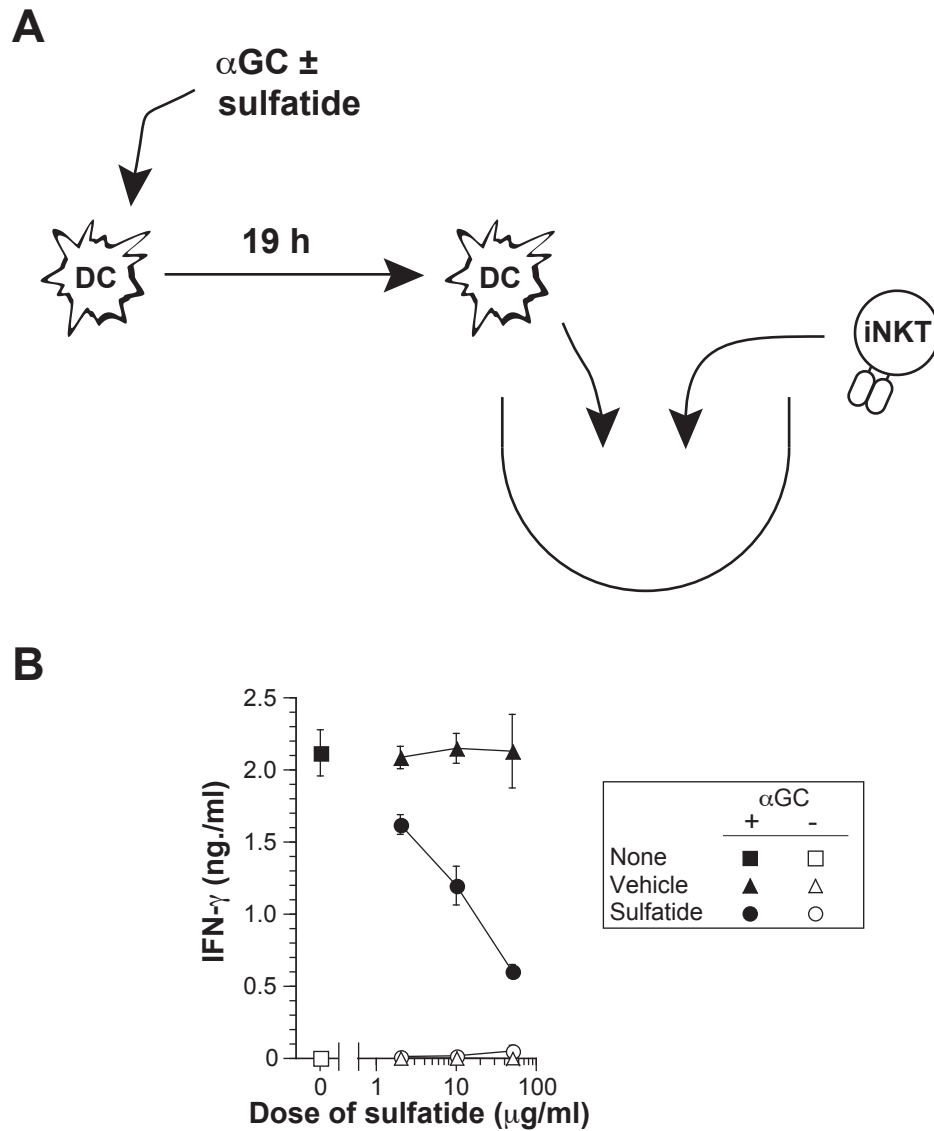


図 9. α GC、sulfatide でパルスした DC の iNKT 細胞の活性化能の評価

(A) 実験の模式図

(B) 脾臓の DC を 100 ng/ml の α GC および 2、10、50 μ g/ml の sulfatide あるいは相当量の vehicle で 19 時間パルスし、洗って iNKT 細胞と共培養した。3 日後、培養上清中の IFN- γ の濃度を ELISA にて測定した。

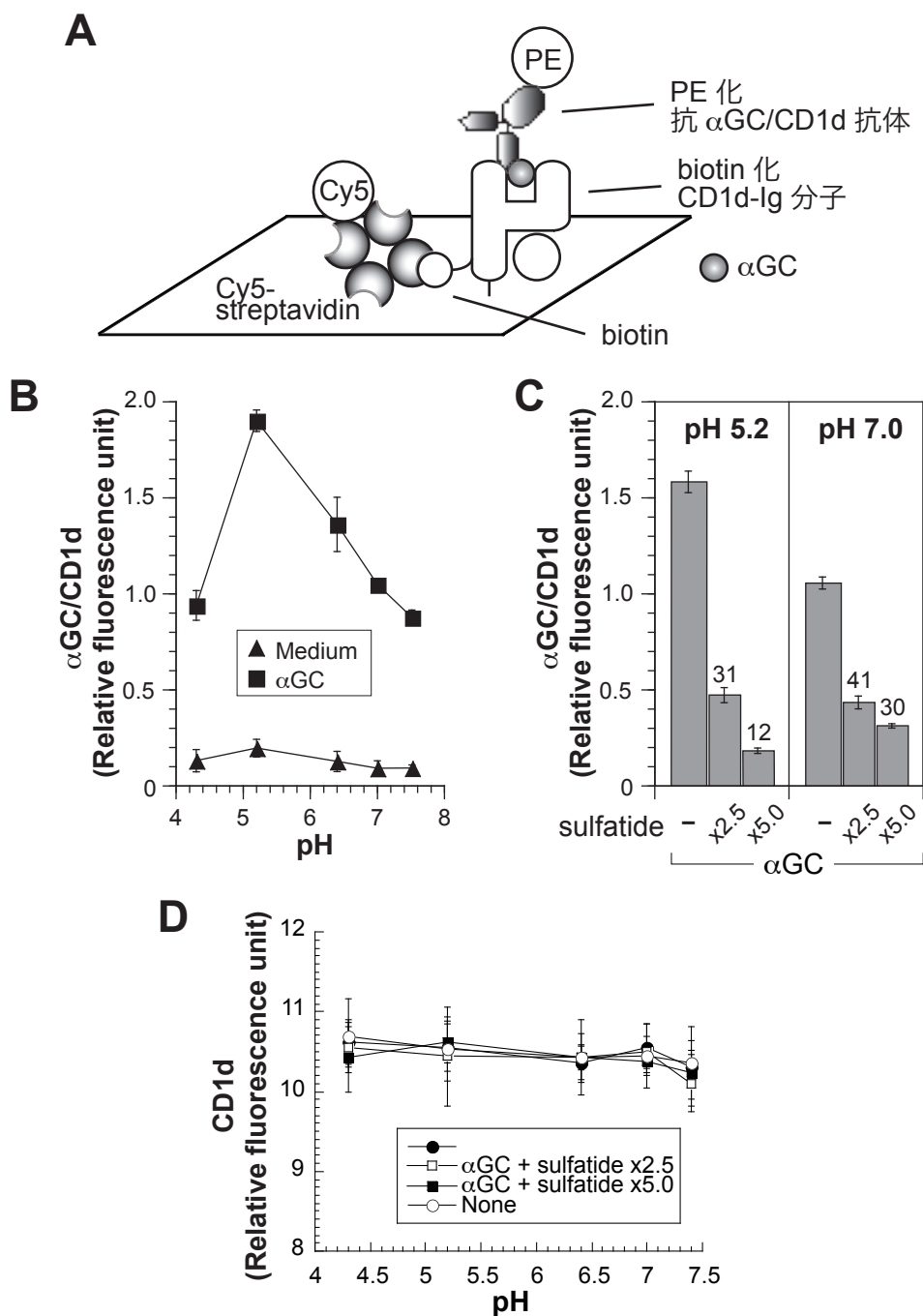


図 10. CD1d 分子への α GC の結合に sulfatide が与える影響の検討

(A) 実験の概念図

(B) プレートに固層化した CD1d-Ig を様々な pH のリン酸クエン酸緩衝液中で 132 nM の α GC と 37°C で 24 時間反応させ、PE 化抗 α GC/CD1d 抗体で染色し、PE の蛍光強度をプレートリーダーで測定した。

(C) pH 5.2 または 7.0 の条件下で、固層化した CD1d-Ig に 132 nM の α GC とその 2.5 または 5 倍の濃度の sulfatide を加え、(A) のように処理して α GC/CD1d の形成量を測定した。図中には各 pH の sulfatide を含まない群の蛍光強度を 100 とした際の相対値を示している。

(D) pH 4.3~7.4 の条件下で (B) と同様に CD1d-Ig と α GC および sulfatide を反応させ、CD1d-Ig をプレートリーダーで定量化した。

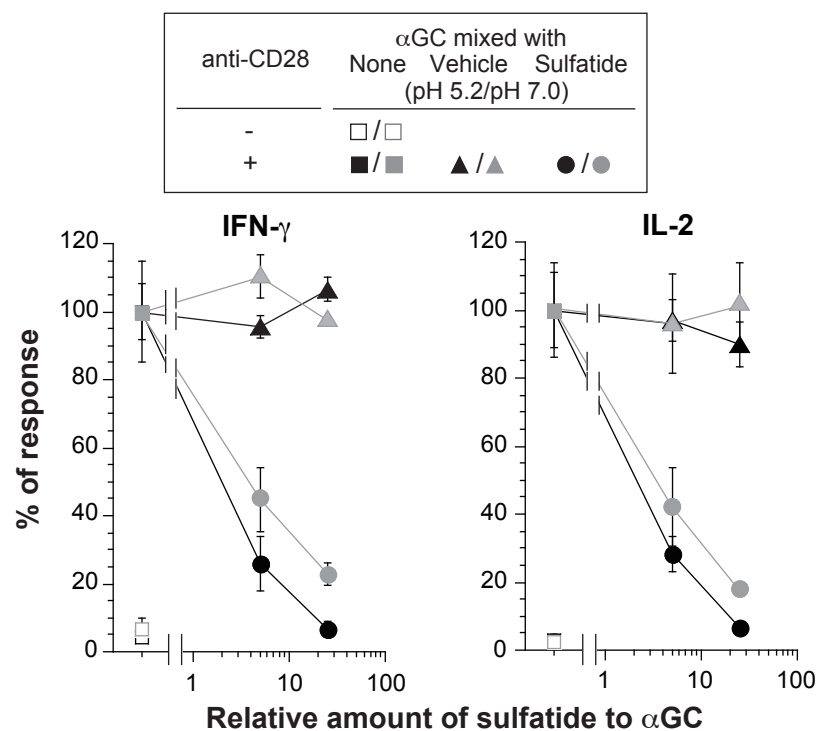


図 11. 固層化した CD1d-Ig 分子による iNKT 細胞の活性化への sulfatide の影響の検討

プレートに固層化した CD1d-Ig を、pH 5.2 または 7.0 で 132 nM の α GC とその 5 倍あるいは 25 倍の濃度の sulfatide とインキュベートし、プレートを洗ってから iNKT 細胞と抗 CD28 抗体を加えて培養した。3 日後の培養上清中の IFN- γ 、IL-2 の濃度を ELISA により測定した。グラフは、CD1d-Ig に α GC のみを加え、その後 iNKT 細胞を加えて抗 CD28 抗体存在下で培養した際の応答を 100 % として表している。

Sulfatide isoform による α GC/CD1d 形成阻害効果の検討

本研究で使用している sulfatide は先行研究で用いられているものと同じで、ウシの脳から調製したものである。この sulfatide にはセラミド部位の脂肪酸側鎖の長さの異なるいくつかの isoform が含まれ、その約 30 %は C24:1 (炭素数 24、不飽和結合数 1)、約 20 %は C24:0 (炭素数 24、不飽和結合なし) の脂肪酸側鎖をもつ。この混合物中のどの sulfatide の isoform がより強い α GC/CD1d 形成阻害効果をもつか検討するために、三つの sulfatide 半合成体、すなわち lysosulfatide (脂肪酸側鎖なし)、palmitoyl sulfatide (C16:0) および tetracosanoyl sulfatide (C24:0) を用いて、図 10 と同様の無細胞系の実験を行った (図 12A、左図)。pH 7.0 では、sulfatide 半合成体のうち tetracosanoyl sulfatide のみ有意に α GC/CD1d 複合体形成を阻害した。有意差はないものの、pH 5.2 でも tetracosanoyl sulfatide 存在下では α GC/CD1d 量が低下する傾向がみられた。CD1d への affinity が弱いことが以前に示唆されている lysosulfatide は[53]、どちらの pH 下でも α GC の CD1d への結合に影響しなかった。また、palmitoyl sulfatide を添加した場合も lysosulfatide と同様 CD1d への結合に対する影響は認められなかった。なお、プレートに固層化された CD1d 分子の量は pH や脂質の添加の影響を受けず、一定であった (図 12A、右図)。

次に DC を用いて、 α GC 存在下で培養した際の α GC/CD1d の提示量に sulfatide 半合成体を与える影響を検討した (図 12B)。Tetracosanoyl sulfatide はウシの脳由来の sulfatide と同等の複合体形成阻害効果をもち、図 12A と一致した結果となった。一方無細胞系では効果がなかった sulfatide 半合成体の内、lysosulfatide には DC の α GC/CD1d 形成阻害活性は認められなかったが、palmitoyl sulfatide は α GC/CD1d 形成を中程度に阻害することが示された。これらの結果から、ウシの脳の sulfatide に多く含まれる tetracosanoyl sulfatide が α GC と CD1d の結合を効果的に阻害することが推測される。

生体内での DC の α GC/CD1d 形成と iNKT 細胞への提示に sulfatide が与える影響の検討

次に、sulfatide 投与が生体内 DC の α GC/CD1d 形成に阻害作用を及ぼすのかどうかを検討した。マウスに α GC と sulfatide の一方あるいは両方を腹腔投与し、4

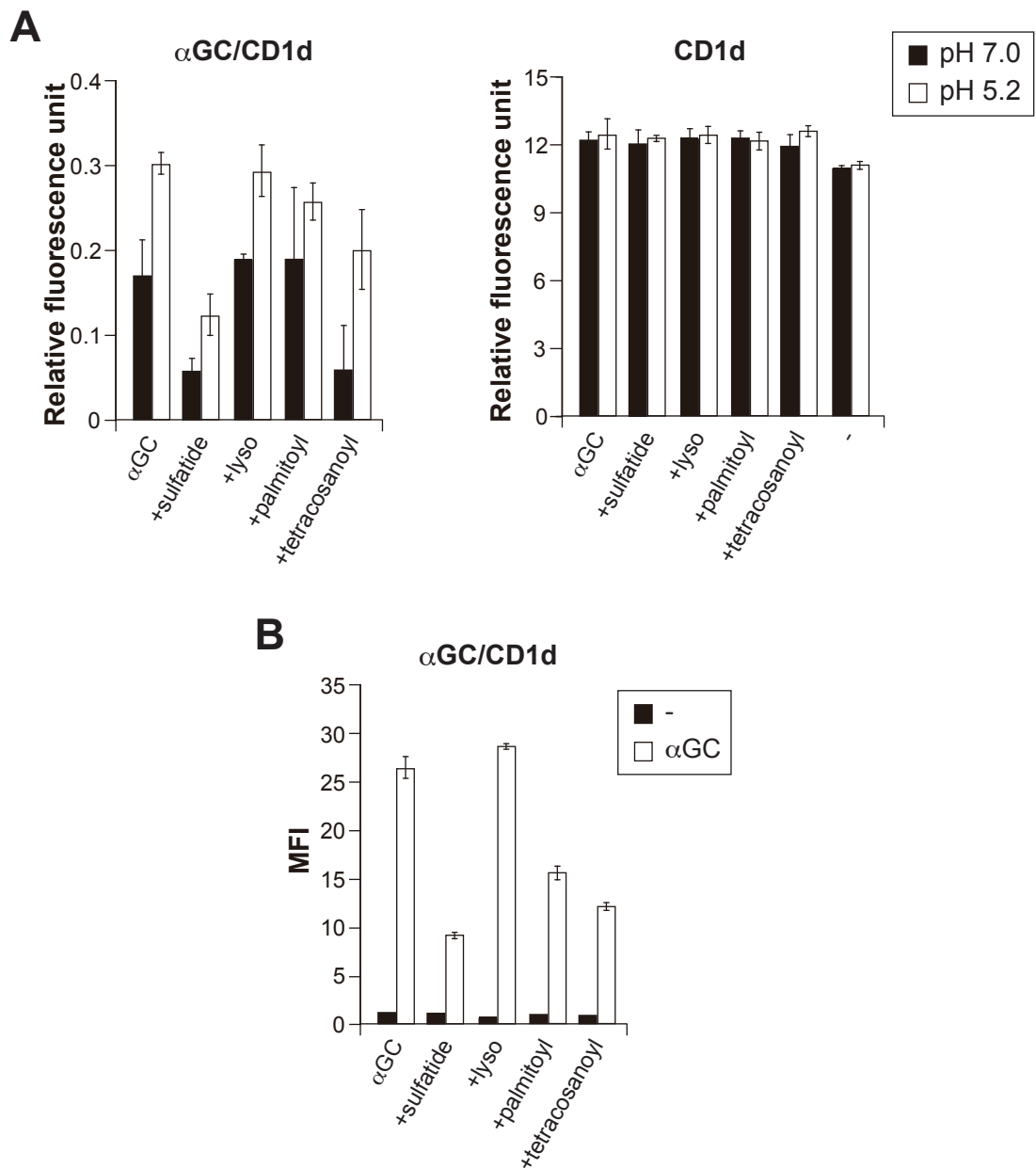


図 12. sulfatide の各 isoform の α GC/CD1d 形成阻害効果の検討

(A) 図 10A と同様のプレートに固層化した CD1d-Ig を用いる実験を、sulfatide (ウシの脳由来)、lysosulfatide、palmitoyl sulfatide または tetracosanoyl sulfatide を用いて行った。各 sulfatide は α GC の 5 倍の濃度を用いた。

(B) 図 8 と同様の脾臓 DC の α GC/CD1d 提示量をみる実験を、sulfatide (ウシの脳由来)、lysosulfatide、palmitoyl sulfatide または tetracosanoyl sulfatide を用いて行った。各 sulfatide の濃度は 12 μ M である。

時間後に脾臓ならびに iNKT 細胞の割合が多い肝臓の DC を調製して細胞表面における α GC/CD1d 表出量を特異的抗体により染色して評価した (図 13A)。その結果、脾臓と肝臓両者の DC において α GC と同時に sulfatide を投与することにより α GC/CD1d 形成量が低下していた。脾臓 DC における平均蛍光強度を算出して比較した結果からも、 α GC 投与マウスの脾臓 DC 上の α GC/CD1d は sulfatide 投与により有意に低下していることが明らかであった (図 13B)。

そこで、 α GC 投与により誘導される血清中のサイトカイン量に対する sulfatide の影響を検討した (図 14)。血清中の IL-4 と TNF- α 産生は sulfatide の同時投与により抑制されることはなく、2 時間の時点での IL-4 は、sulfatide 投与群の方が少し高い値を示したものの有意差はなかった。これに対し IFN- γ や IL-12p70 の濃度上昇は sulfatide 投与により強く抑制された。とりわけ、刺激後 10 時間以降で認められる NK 細胞によるとされる IFN- γ 産生が低下していることが明らかとなった。

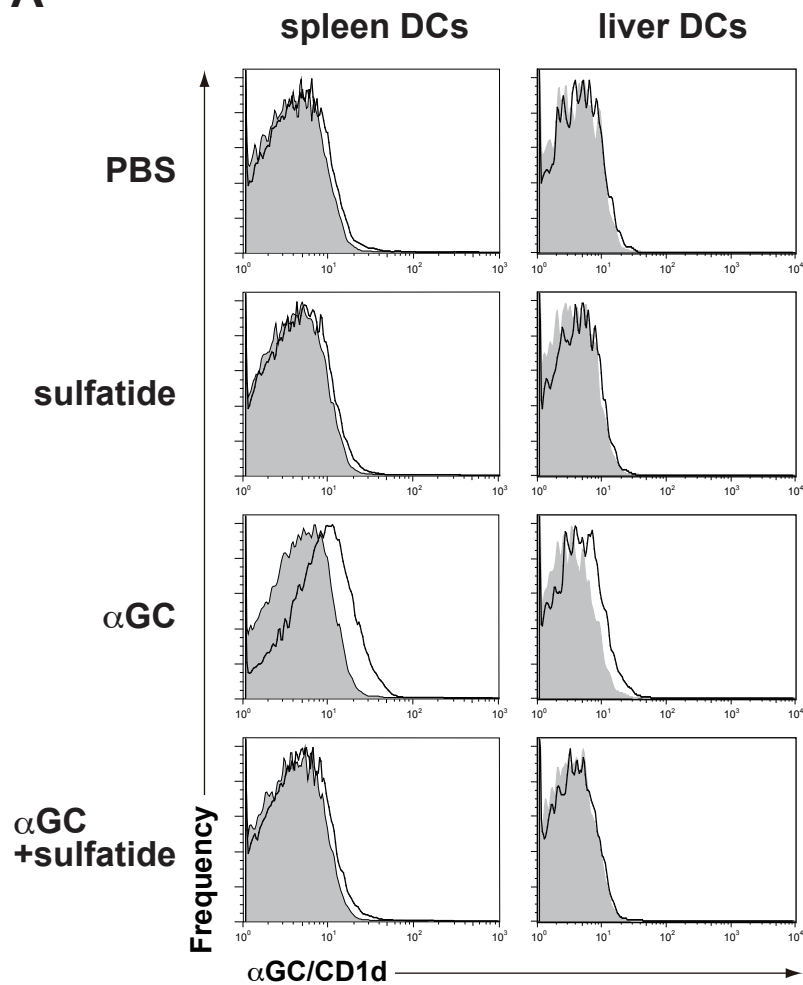
α GC/CD1d とインバリエント TCR を介した DC と iNKT 細胞の相互作用は、DC の CD40、CD86 と iNKT 細胞の CD40L の発現量増加を誘導する。CD40 と CD40L の相互作用は DC の IL-12p70 産生増強に重要であり [47]、この IL-12p70 は NK 細胞による IFN- γ 産生に必須である [55]。そこで、これらの細胞間相互作用に関与する分子の発現を、iNKT 細胞上の CD40L、DC 上の CD40 と CD86 に注目して検討した。その結果、iNKT 細胞上の CD40L の発現は α GC 投与後 3 時間でピークになり、DC 上の CD40 および CD86 は 2 時間を過ぎたころから上昇することが示された (図 15A)。

3 時間の時点における、DC の発現する CD40、CD86 の量は sulfatide の影響を受けなかったが、iNKT 細胞の CD40L の発現レベルの上昇は α GC と同時に sulfatide を投与した群では大きく抑制された (図 15B)。以上の結果は、DC の α GC/CD1d 表出量の低下により iNKT 細胞と DC の相互作用の強度あるいは頻度が減少していること示すものと考えられる。

CD4 T 細胞の活性化に sulfatide が与える影響の検討

抗原提示において、CD1d 分子と MHC クラス II 分子を介する抗原の負荷は共に食作用能に依存するという点で類似している [56]。そこで、sulfatide が MHC

A



B

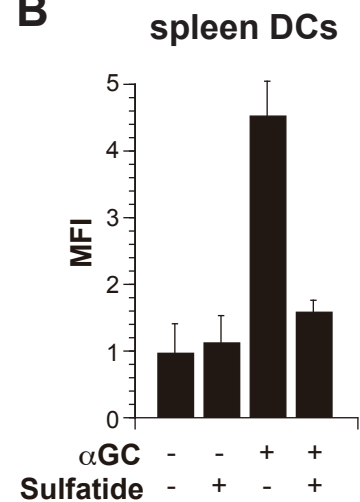


図 13. *in vivo* での sulfatide の α GC/CD1d 提示の阻害作用の検討

マウスに vehicle (200 μ l の PBS)、 α GC 4 μ g、sulfatide 30 μ g、または α GC と sulfatide 両方を腹腔投与し、4 時間後に脾細胞あるいは肝臓の細胞を染色して、DC 上の α GC/CD1d 量を flowcytometer により測定した。(A) 脾細胞 (左のヒストグラム) は CD11⁺ の細胞に、肝臓の細胞 (右のヒストグラム) は CD11c⁺CD11b^{low} の細胞にゲートをかけてある。(B) 棒グラフは各群 3 匹のマウスの脾細胞の結果をまとめたものである。

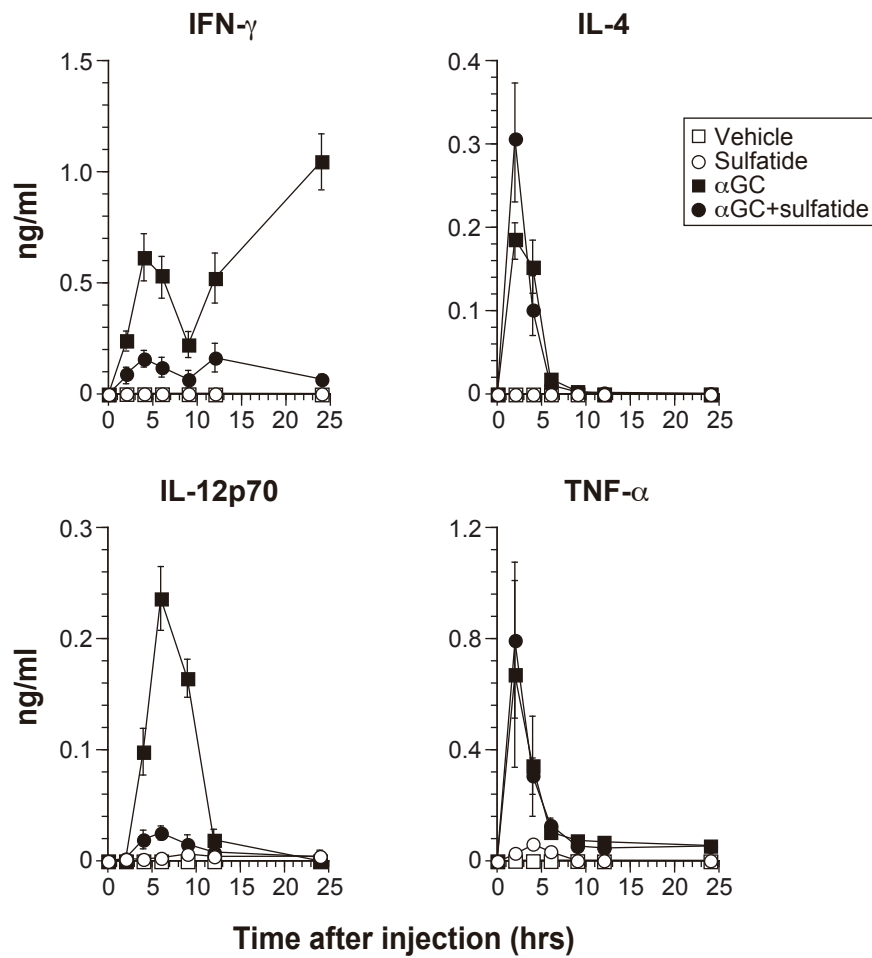


図 14. αGC 投与により誘導される血清中のサイトカインに sulfatide が与える影響の検討

マウスに vehicle (200 μl の PBS)、αGC 4 μg、sulfatide 30 μg、または αGC と sulfatide 両方を腹腔投与し、経時的に採血して血清中のサイトカインの濃度を CBA により測定した。図は各群 3 匹のマウスの結果をまとめたものである。

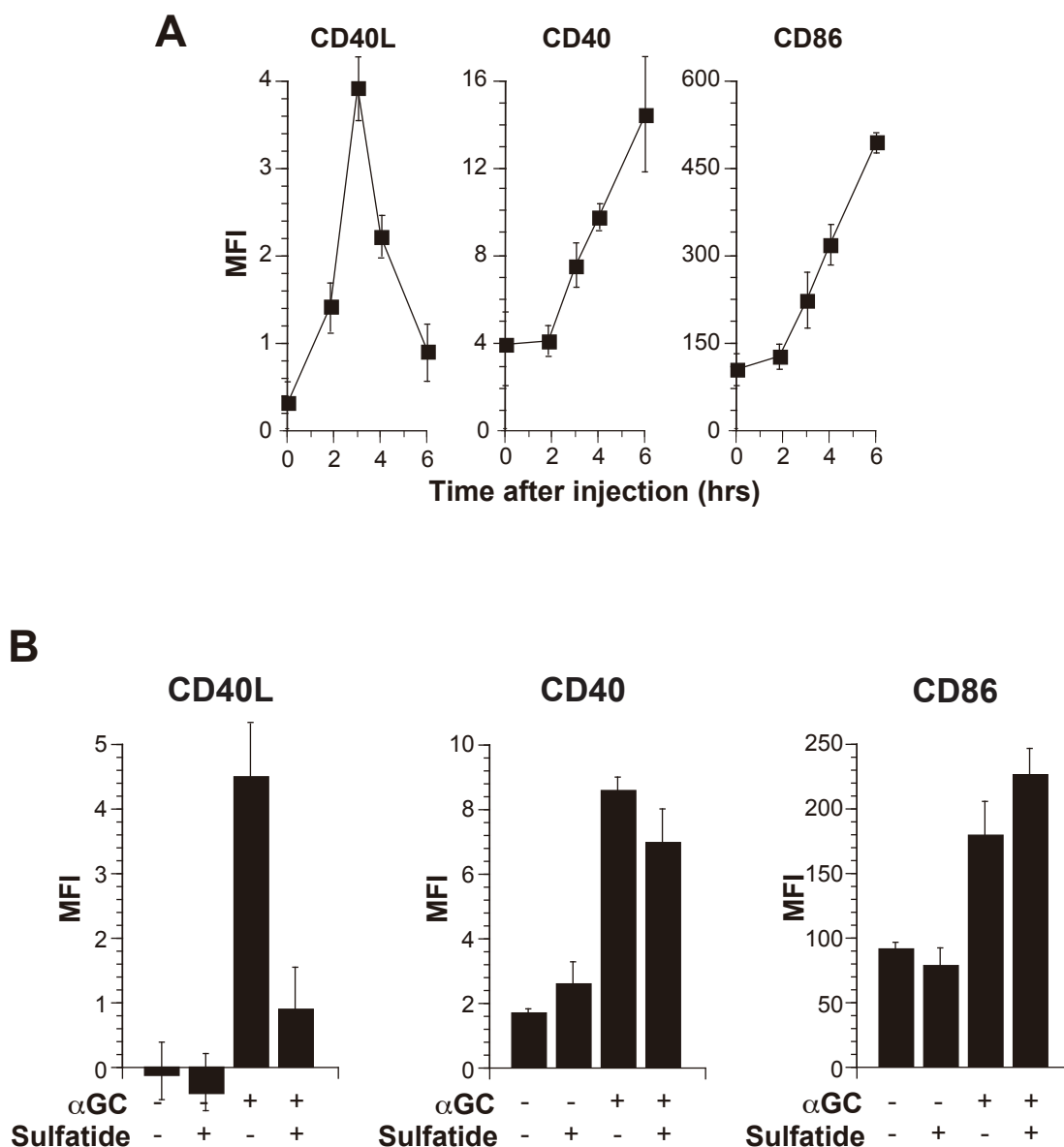


図 15. α GC 投与による iNKT 細胞および DC の活性化への sulfatide の作用の検討

(A) マウスに α GC 4 μ g を腹腔投与し、2、4、6 時間後に脾細胞を調製して染色し、flowcytometer により iNKT 細胞上の CD40L と DC 上の CD40 および CD86 の発現レベルをそれぞれ測定した。iNKT 細胞は α GC/CD1d⁺B220⁻、DC は CD11c⁺ にゲートをかけてある。図は各群 2 匹のマウスの結果をまとめたものである。

(B) マウスに vehicle (200 μ l の PBS)、 α GC 4 μ g、sulfatide 30 μ g、または α GC と sulfatide 両方を腹腔投与し、3 時間後に (A) と同様に染色し測定した。CD40L は iNKT 細胞、CD40 と CD86 は DC が発現しているものをみている。グラフは各群 3 匹のマウスの結果をまとめたものである。

クラス II 分子を介した CD4 T 細胞へのペプチド抗原の提示に干渉するかどうか検討した。iNKT 細胞を欠く J α 281 欠損マウスに CFSE で標識した OT-II T 細胞 (CD4⁺) を移入し、翌日に OVA 蛋白を単独あるいは sulfatide と同時に腹腔投与し、3 日後に OVA 由来のペプチド/MHC クラス II 分子複合体を認識し活性化した OT-II T 細胞の増殖を検討した。その結果、抗原特異的 T 細胞の増殖には sulfatide は影響しないことが示された (図 16)。したがって、sulfatide は CD1d を介する α GC の提示には抑制的に作用するが、MHC クラス II を介する抗原提示には作用しないことが明らかになった。

以上の結果を踏まえ申請者は、sulfatide が α GC による iNKT 細胞の活性化を阻害するのは、主として CD1d を介した α GC の提示を阻害しているためであるという結論に至った。

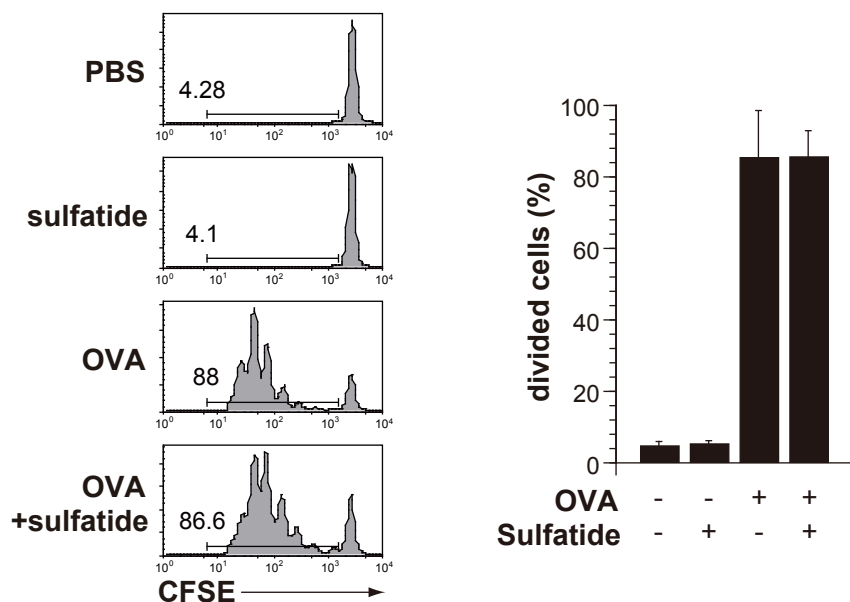


図 16. CD4 T 細胞の活性化に sulfatid が与える影響の検討

OT-II マウスから調製した CD4 T 細胞を CFSE で標識し、J α 281 欠損マウスに移入した。翌日、vehicle (200 μ l の PBS)、OVA 30 μ g、sulfatide 30 μ g、または OVA と sulfatide 両方を腹腔内投与し、その 3 日後に脾細胞を染色して移入した OT-II T 細胞の増殖を flowcytometer により測定した。ヒストグラムは $CFSE^+CD4^+$ の細胞にゲートを設定して解析した。棒グラフは各群 3 匹のマウスの結果をまとめたものである。

考察

iNKT 細胞は CD1d 依存的に、微生物感染[57]やウイルス感染に対する応答[58]、抗腫免疫応答[59]や自己免疫疾患[60]といった様々な生体防御機構に寄与することが知られている。このため、iNKT 細胞の応答を制御することには重要な意義がある。近年、sulfatide は non-iNKT 細胞の働きを介して、iNKT 細胞が誘導する免疫応答を抑制する作用を持つことが報告されている[31, 32, 34, 35]。これらの研究では、sulfatide をマウスに投与してその抑制作用を検討する手法を主に用いており、細胞レベルでの sulfatide の詳細な作用は追究されていない。そのため、non-iNKT 細胞が産生するサイトカインの直接あるいは間接の作用は示唆されてはいるものの、厳密な作用機構は不明である。特に、精製した non-iNKT 細胞の sulfatide への応答の検討がなされていない。また、主要な抗原提示細胞である DC の α GC 提示に対する影響についての報告もない。そこで本研究において iNKT 細胞の応答への sulfatide の影響を精査した。その結果、sulfatide は単独で non-iNKT 細胞を介さなくても、 α GC による iNKT 細胞の活性化を低下させることが明らかとなった。さらに sulfatide の抑制作用は主に DC の α GC/CD1d 提示の阻害に拠ることが示された。

DC 存在下で α GC により刺激した精製した iNKT 細胞の IFN- γ 、IL-4 および IL-2 の産生量は sulfatide 添加により低下したことから、non-iNKT 細胞を介さない抑制作用を sulfatide がもつことが示された (図 5)。しかし、IFN- γ や IL-2 の産生量低下は 2 μ g/ml の sulfatide で認められたのに対して、IL-4 の産生量を低下させるには 10 μ g/ml より多量の sulfatide が必要であった。iNKT 細胞の IL-4 産生に必要な刺激の閾値は IL-2 や IFN- γ に比べて低いため[61]、sulfatide の影響が現れにくくなっているからだと考えられる。

α GC が効率良く CD1d と結合するのはエンドソーム/リソソーム内であることが示されている[51-53]。これらの報告と一致して、プレートに固層化した CD1d-Ig 分子への α GC の結合量は生理的な pH より pH 5.2 のときの方が多かった (図 10)。CD1d と同じ MHC クラス I 様の分子であるヒト CD1b も脂質抗原を T 細胞に提示する働きをもつが[18]、CD1b の場合、炭化水素鎖が入る疎水性ポケットの入り口にあたる α -ヘリックスが酸性条件下では少し開き、これが低 pH で CD1b が脂質抗原と良く結合することの一因である可能性が示唆されている[62]。このことから、CD1d でも同様な α -ヘリックスの構造変化が起こる可能性

が考えられる。一方、ヒトの CD1d もマウスの CD1d も、炭化水素鎖が入る F' ポケットの入り口付近にアスパラギン酸（80 番目）があり、これは生理的 pH では負に帯電している[63]。これが pH の低下によって中和されることが、 α GC の CD1d への親和性を上げる可能性も推測される。

プレートに固層化した CD1d 分子への α GC の結合には非イオン性界面活性剤の Triton X-100 (0.05%) あるいは saposin B が有効に作用することが示されている[52, 64]。Saposin B はスフィンゴ脂質のリソソームでの分解に生理的役割を担うと考えられている分子であるが[65]、リン脂質に結合し、膜間での輸送にも関与していることも報告されており、その作用は酸性条件下で最大の効果をもつことが明らかである[66]。Saposin B による α GC の CD1d への結合を促進する働きは pH 6.0 において至適であることから、Saposin B はリソソームではなくエンドソームで作用している可能性が指摘されている[64]。本研究の CD1d 分子をプレートに固層化する系では Triton X も saposin B も加えていない。しかし、 α GC の vehicle に含まれる同じく非イオン性界面活性剤の Tween 20 が Triton-X-100 と同様に、その CD1d への結合を補助した可能性は残る。

本研究で主に使用した sulfatide はウシの脳から精製したもので、いくつかの炭化水素鎖の異なる isoform からなる。このうち約 30 %は C24:1、20 %は C24:0（すなわち tetracosanoyl sulfatide）、約 10 %が C24:0 2 OH (2 番目の炭素がヒドロキシル化されたもの)であり、palmitoyl sulfatide (C16:0) および lysosulfatide はそれぞれ 1 %および 5 %以下である。図 12 に示すように、sulfatide 半合成体のなかでは tetracosanoyl sulfatide が、CD1d-Ig を用いた系および脾臓 DC を用いた系で顕著に α GC/CD1d 複合体形成を阻害した。一方 lysosulfatide は複合体形成阻害効果を持たなかった。Non-iNKT 細胞株の Hy19.3 や、その親細胞株である XV19 は脾細胞等により提示された palmitoyl sulfatide や tetracosanoyl sulfatide には応答せず、lysosulfatide を認識して IL-2 を産生することが報告されており[53, 67]、これらの細胞株の TCR と lysosulfatide/CD1d 複合体の結合は結晶構造解析により明らかにされている[68, 69]。したがって、lysosulfatide は CD1d に対する親和性が低い故に α GC の CD1d への結合を競合阻害しないが、生体内においては lysosulfatide 応答性の non-iNKT 細胞を活性化して、iNKT 細胞を含め他の細胞の応答性に影響を及ぼしている可能性は否定できない。しかし、EAE の症状緩和に有用な isoform は C24:1 の sulfatide であり、tetracosanoyl sulfatide や lysosulfatide は効果を持たないことも示された[30]。したがって、異なる TCR を発現する non-iNKT 細胞がそれぞれのリガンドを認識することにより影響をおよぼしてい

る可能性がある。

肝炎や肺の炎症、肝臓の虚血性再灌流傷害、抗癌免疫応答の研究で使用され、応答への抑制効果が示された sulfatide は本研究で主に使用しているものと同じウシの脳から精製したものである。しかし、この sulfatide を脾細胞や NKT 細胞に添加しても IL-2 の産生はみられなかった (図 3、4)。したがってこの sulfatide 中には lysosulfatide 応答性の non-iNKT 細胞を活性化させるのに十分な lysosulfatide が含まれていないか、脾細胞中には Hy19.3 や XV19 に相当する lysosulfatide 応答性の non-iNKT 細胞の数が非常に少ないのかもしれない。興味深いことに、脾細胞を使用した実験とは異なり、プレートに固相化された CD1d 分子に提示された palmitoyl および tetracosanoyl sulfatide は Hy19.3 の活性化を誘導することが報告されている [68]。この報告をした筆者らは、palmitoyl や tetracosanoyl sulfatide が抗原提示細胞内で分解されてしまう可能性や細胞表面に効率良く提示されない可能性を指摘している。しかし申請者の結果では図 12B に示したように、これらの sulfatide は脾臓 DC の α GC/CD1d 提示を阻害している。したがってこれらの sulfatide は CD1d に結合した状態で細胞表面に提示されているものと考えられる。

この現象を説明する仮説としては、脾臓 DC に取り込まれた後これらの sulfatide は何らかの処理を受けて、CD1d とは結合するものの、sulfatide 応答性 non-iNKT 細胞の活性化能を持たないような別の構造体に変化する可能性が考えられる。いずれにしても本研究や以前の研究でみられた sulfatide の作用に lysosulfatide 応答性の non-iNKT 細胞が関与している可能性は低い。ただ、脾臓以外の肝臓などの組織に non-iNKT 細胞が多く存在し、これらが何らかの作用を及ぼす可能性は否定できない。Sulfatide は CD1a、CD1b あるいは CD1c に結合してヒトの CD1 拘束性 T 細胞のサイトカイン産生を引き起こすことが知られているが [70]、ヒトの sulfatide 応答性 NKT 細胞に関する報告は見当たらない。NK および NKT 細胞を含むヒトの血中 CD161 陽性細胞は DC の提示する CD24:1 sulfatide を認識しないことを考慮すれば [71]、ヒトにおける sulfatide 応答性 non-iNKT 細胞の機能の解明には、存在そのものの証明を含めた多くの課題が残されている。

C16:0 の sulfatide はラットの脾臓に豊富であるが [72]、炭素数 24 の sulfatide はラットやウシの脳、ハムスターの腎臓、ヒトの末梢及び中枢神経系に多く存在する [1, 73, 74]。多発性硬化症のマウスモデルである EAE において、IL-4 を産生

する iNKT 細胞は抑制的に働くことが示されている[75]ことを考慮すると、多発性硬化症でみられる脱ミエリン化により漏れだした炭素数 24 の sulfatide が、iNKT 細胞の内因性リガンドの CD1d への結合量を低下させて、図 5 のように IL-4 を主に産生する iNKT 細胞を誘導し、炎症の悪化を防いでいる可能性もある。

α GC を投与すると、iNKT 細胞と脾臓の DC が活性化することが知られているが、本研究のマウスに α GC を腹腔内投与する実験でも、DC と iNKT 細胞表面の共刺激分子 (CD40、CD86) および CD40L の発現レベルがそれぞれ上昇した (図 15A)。一方、iNKT 細胞の CD40L の発現レベルの上昇は sulfatide 投与により抑えられた (図 15B)。これは DC の α GC/CD1d 提示量の低下によるものと考えられる (図 13)。ところが、DC の CD40 および CD86 の発現レベルの上昇は sulfatide の影響を受けなかった (図 15B)。 α GC 投与後 3 時間前後での血清中の TNF- α の濃度は sulfatide に影響されないため (図 14)、この TNF- α が DC の成熟を誘導するのに十分であった可能性が考えられる[47]。しかし、iNKT 細胞の CD40L の発現は sulfatide 投与により抑制され、CD40 からの DC へのシグナルが弱まることから、血清中の IL-12p70 濃度の低下につながったと考えられる (図 14)。しかも、これがさらに iNKT 細胞や、後期の NK 細胞[76]による IFN- γ 産生量低下の原因であると推測される (図 14)。

CD1d 分子は細胞質内でなく小胞内の抗原を提示する分子である[18, 56]。CD1d は翻訳されてトランスゴルジネットワークを経て、多くは細胞膜へと輸送されるが、一部はインバリアント鎖と会合した状態でリソソームあるいは MHC クラス II 分子が豊富な MHC class II compartment (MIIC) に輸送される[18]。また細胞表面に輸送された CD1d も一部はアダプター蛋白の AP2 および AP3 によりリソソームや MIIC に運ばれることも知られている[18]。さらに、取り込まれた α GC は主にエンドソーム／リソソームで CD1d に結合する[77]。一方、MHC クラス II によって提示される抗原ペプチドも蛋白として細胞内に取り込まれた後、エンドソーム／リソソームでの消化分解を受け、インバリアント鎖によって輸送されてきた MHC クラス II 分子に結合する[78, 79]。このように CD1d および MHC クラス II へのそれぞれ脂質、蛋白抗原の負荷の場は同じであるが、OVA 特異的 OT-II T 細胞の活性化による細胞増殖は sulfatide に影響されなかった (図 16)。したがって sulfatide は DC の蛋白抗原の提示能や DC 内での CD1d 輸送等に悪影響を及ぼさないと考えられる。

IL-12 は抗癌免疫応答を誘導することができる[80]。Ambrosino らは α GC 投与による結腸癌細胞株 CT26 の肺転移の抑制効果が sulfatide により阻害されることを示している[35]。IL-12 を産生する DC は CT26 に対する細胞傷害性 T 細胞の応答を強く誘導することを考慮すれば[81]、sulfatide の抗癌免疫抑制作用は、DC の IL-12p70 産生の阻害を介したものであり、sulfatide 応答性の non-iNKT 細胞がいなくても抗癌免疫は抑制される可能性がある。

図 3、4 や図 14 に示すように、sulfatide 単独の添加では *in vitro* でも *in vivo* でも sulfatide 応答性の細胞による IFN- γ 、IL-4 や IL-2 の産生はみられなかった。また IL-10 や IL-13 の産生もこれまでのところ申請者の手では検出できていない (data not shown)。Sulfatide 応答性の non-iNKT 細胞の活性化には、TCR による sulfatide/CD1d の認識に加えて α GC により活性化した iNKT 細胞が分泌する IL-2 などの因子も必要なのかもしれない。Sulfatide 応答性の non-iNKT 細胞の機能の解明にはより詳細な研究が必要であるが、本研究の結果から、sulfatide による iNKT 細胞の活性化の阻害の主要な原因は、 α GC と CD1d の結合を sulfatide が阻害することであると考えられる。

前述したように sulfatide はグリア細胞などの活性に影響を与えることから、DC への直接の作用があることも考えられる。本研究の実験系では DC の成熟や蛋白抗原の提示への sulfatide の影響はみられなかったが、今後様々な刺激に対する DC の応答に sulfatide が与える影響を検討することで、sulfatide が生体応答に与える影響の詳細がより明らかになることを期待する。

謝辞

本研究は、京都大学大学院 生命科学研究科 高次生命科学専攻 生体応答学分野の稲葉カヨ教授、高原和彦講師ならびに伊豫田智典元助教（現・理化学研究所博士研究員）のご指導のもと行われました。懇切なるご指導と大変有意義なご助言を頂きましたことを、心から感謝致します。

また、研究を進めるにあたり多大なる協力をしてくださった田角裕介さんをはじめとする生体応答学研究室の在学生および卒業生の皆様に厚くお礼申し上げます。

研究に必要な試薬を提供してくださった理化学研究所の渡会浩志博士に感謝致します。

最後に経済的、精神的に支えてくれた両親に深く感謝致します。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。
Mitsuhiro Kanamori, Yusuke Tasumi, Tomonori Iyoda, Maki Ushida and Kayo Inaba
Sulfatide inhibits α -galactosylceramide presentation by dendritic cells
International Immunology, 24, 129-136, 2012

参考文献

1. Svennerholm L., Bostrom K., Fredman P., Jungbjer B., Mansson J.E. and Rynmark B.M. 1992. Membrane lipids of human peripheral nerve and spinal cord. *Biochim Biophys Acta* 1128(1): 1-7.
2. Tadano-Aritomi K., Hikita T., Fujimoto H., Suzuki K., Motegi K. and Ishizuka I. 2000. Kidney lipids in galactosylceramide synthase-deficient mice. Absence of galactosylsulfatide and compensatory increase in more polar sulfoglycolipids. *J Lipid Res* 41(8): 1237-43.
3. Buschard K., Blomqvist M., Osterbye T. and Fredman P. 2005. Involvement of sulfatide in beta cells and type 1 and type 2 diabetes. *Diabetologia* 48(10): 1957-62.
4. Nakajima T., Kamijo Y., Yuzhe H., Kimura T., Tanaka N., Sugiyama E., Nakamura K., Kyogashima M., Hara A. and Aoyama T. 2013. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates enhancement of gene expression of cerebroside sulfotransferase in several murine organs. *Glycoconj J* 30(6): 553-60.
5. Honke K., Hirahara Y., Dupree J., Suzuki K., Popko B., Fukushima K., Fukushima J., Nagasawa T., Yoshida N., Wada Y. and Taniguchi N. 2002. Paranodal junction formation and spermatogenesis require sulfoglycolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7): 4227-32.
6. Batzios S.P. and Zafeiriou D.I. 2012. Developing treatment options for metachromatic leukodystrophy. *Mol Genet Metab* 105(1): 56-63.
7. Buschard K., Josefsen K., Horn T. and Fredman P. 1993. Sulphatide and sulphatide antibodies in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 342(8875): 840.
8. Andersson K., Buschard K., Fredman P., Kaas A., Lidstrom A.M., Madsbad S., Mortensen H. and Jan-Eric M. 2002. Patients with insulin-dependent diabetes but not those with non-insulin-dependent diabetes have anti-sulfatide antibodies as determined with a new ELISA assay. *Autoimmunity* 35(7): 463-8.
9. Kanter J.L., Narayana S., Ho P.P., Catz I., Warren K.G., Sobel R.A., Steinman L. and Robinson W.H. 2006. Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation. *Nat Med* 12(1): 138-43.

10. Li G. and Hu R. 2014. Association between serum sulfatide and carotid intima media thickness in patients with familial hypercholesterolemia. *Glycoconj J*.
11. Aruffo A., Kolanus W., Walz G., Fredman P. and Seed B. 1991. CD62/P-selectin recognition of myeloid and tumor cell sulfatides. *Cell* 67(1): 35-44.
12. Garcia J., Callewaert N. and Borsig L. 2007. P-selectin mediates metastatic progression through binding to sulfatides on tumor cells. *Glycobiology* 17(2): 185-96.
13. Yoda Y., Gasa S., Makita A., Fujioka Y., Kikuchi Y. and Hashimoto M. 1979. Glycolipids in human lung carcinoma of histologically different types. *J Natl Cancer Inst* 63(5): 1153-60.
14. Sakakibara N., Gasa S., Kamio K., Makita A. and Koyanagi T. 1989. Association of elevated sulfatides and sulfotransferase activities with human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 49(2): 335-9.
15. Kobayashi T., Honke K., Kamio K., Sakakibara N., Gasa S., Miyao N., Tsukamoto T., Ishizuka I., Miyazaki T. and Makita A. 1993. Sulfolipids and glycolipid sulfotransferase activities in human renal cell carcinoma cells. *Br J Cancer* 67(1): 76-80.
16. Liu Y., Chen Y., Momin A., Shaner R., Wang E., Bowen N.J., Matyunina L.V., Walker L.D., McDonald J.F., Sullards M.C. and Merrill A.H., Jr. 2010. Elevation of sulfatides in ovarian cancer: an integrated transcriptomic and lipidomic analysis including tissue-imaging mass spectrometry. *Mol Cancer* 9: 186.
17. Morichika H., Hamanaka Y., Tai T. and Ishizuka I. 1996. Sulfatides as a predictive factor of lymph node metastasis in patients with colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 78(1): 43-7.
18. Barral D.C. and Brenner M.B. 2007. CD1 antigen presentation: how it works. *Nat Rev Immunol* 7(12): 929-41.
19. Zajonc D.M., Maricic I., Wu D., Halder R., Roy K., Wong C.H., Kumar V. and Wilson I.A. 2005. Structural basis for CD1d presentation of a sulfatide derived from myelin and its implications for autoimmunity. *J Exp Med* 202(11): 1517-26.
20. Koch M., Stronge V.S., Shepherd D., Gadola S.D., Mathew B., Ritter G., Fersht A.R., Besra G.S., Schmidt R.R., Jones E.Y. and Cerundolo V. 2005. The crystal

- structure of human CD1d with and without alpha-galactosylceramide. *Nat Immunol* 6(8): 819-26.
21. Kawano T., Cui J., Koezuka Y., Toura I., Kaneko Y., Motoki K., Ueno H., Nakagawa R., Sato H., Kondo E., Koseki H. and Taniguchi M. 1997. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278(5343): 1626-9.
 22. Spada F.M., Koezuka Y. and Porcelli S.A. 1998. CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells. *J Exp Med* 188(8): 1529-34.
 23. Rossjohn J., Pellicci D.G., Patel O., Gapin L. and Godfrey D.I. 2012. Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells. *Nat Rev Immunol* 12(12): 845-57.
 24. Park S.H., Weiss A., Benlagha K., Kyin T., Teyton L. and Bendelac A. 2001. The mouse CD1d-restricted repertoire is dominated by a few autoreactive T cell receptor families. *J Exp Med* 193(8): 893-904.
 25. Jahng A., Maricic I., Aguilera C., Cardell S., Halder R.C. and Kumar V. 2004. Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide. *J Exp Med* 199(7): 947-57.
 26. Arrenberg P., Halder R., Dai Y., Maricic I. and Kumar V. 2010. Oligoclonality and innate-like features in the TCR repertoire of type II NKT cells reactive to a beta-linked self-glycolipid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(24): 10984-9.
 27. Terabe M., Matsui S., Park J.M., Mamura M., Noben-Trauth N., Donaldson D.D., Chen W., Wahl S.M., Ledbetter S., Pratt B., Letterio J.J., Paul W.E. and Berzofsky J.A. 2003. Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med* 198(11): 1741-52.
 28. Fuss I.J., Heller F., Boirivant M., Leon F., Yoshida M., Fichtner-Feigl S., Yang Z., Exley M., Kitani A., Blumberg R.S., Mannon P. and Strober W. 2004. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 113(10): 1490-7.
 29. Subramanian L., Blumenfeld H., Tohn R., Ly D., Aguilera C., Maricic I., Mansson J.E., Buschard K., Kumar V. and Delovitch T.L. 2012. NKT cells stimulated by long fatty acyl chain sulfatides significantly reduce the incidence

- of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice [corrected]. *PLoS One* 7(5): e37771.
30. Maricic I., Halder R., Bischof F. and Kumar V. 2014. Dendritic cells and anergic type I NKT cells play a crucial role in sulfatide-mediated immune regulation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 193(3): 1035-46.
 31. Arrenberg P., Maricic I. and Kumar V. 2011. Sulfatide-Mediated Activation of Type II Natural Killer T Cells Prevents Hepatic Ischemic Reperfusion Injury In Mice. *Gastroenterology* 140(2): 646-55.
 32. Halder R.C., Aguilera C., Maricic I. and Kumar V. 2007. Type II NKT cell-mediated anergy induction in type I NKT cells prevents inflammatory liver disease. *J Clin Invest* 117(8): 2302-12.
 33. Lisbonne M., Diem S., de Castro Keller A., Lefort J., Araujo L.M., Hachem P., Fourneau J.M., Sidobre S., Kronenberg M., Taniguchi M., Van Endert P., Dy M., Askenase P., Russo M., Vargaftig B.B., Herbelin A. and Leite-de-Moraes M.C. 2003. Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model. *J Immunol* 171(4): 1637-41.
 34. Zhang G., Nie H., Yang J., Ding X., Huang Y., Yu H., Li R., Yuan Z. and Hu S. 2011. Sulfatide-activated type II NKT cells prevent allergic airway inflammation by inhibiting type I NKT cell function in a mouse model of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 301(6): L975-84.
 35. Ambrosino E., Terabe M., Halder R.C., Peng J., Takaku S., Miyake S., Yamamura T., Kumar V. and Berzofsky J.A. 2007. Cross-regulation between type I and type II NKT cells in regulating tumor immunity: a new immunoregulatory axis. *J Immunol* 179(8): 5126-36.
 36. Jeon S.B., Yoon H.J., Park S.H., Kim I.H. and Park E.J. 2008. Sulfatide, a major lipid component of myelin sheath, activates inflammatory responses as an endogenous stimulator in brain-resident immune cells. *J Immunol* 181(11): 8077-87.
 37. Popovic Z.V., Sandhoff R., Sijmonsma T.P., Kaden S., Jennemann R., Kiss E., Tone E., Autschbach F., Platt N., Malle E. and Grone H.J. 2007. Sulfated glycosphingolipid as mediator of phagocytosis: SM4s enhances apoptotic cell clearance and modulates macrophage activity. *J Immunol* 179(10): 6770-82.

38. Higashi H., Suzuki Y., Mukaida N., Takahashi N., Miyamoto D. and Matsushima K. 1997. Intervention in endotoxin shock by sulfatide (I3SO₃-GalCer) with a concomitant reduction in tumor necrosis factor alpha production. *Infect Immun* 65(4): 1223-7.
39. Bovin L.F., Fredman P., Mansson J.E., Buschard K. and Bendtzen K. 1999. In vitro production of cytokines is influenced by sulfatide and its precursor galactosylceramide. *FEBS Lett* 455(3): 339-43.
40. Roeske-Nielsen A., Fredman P., Mansson J.E., Bendtzen K. and Buschard K. 2004. Beta-galactosylceramide increases and sulfatide decreases cytokine and chemokine production in whole blood cells. *Immunol Lett* 91(2-3): 205-11.
41. Mycko M.P., Sliwinska B., Cichalewska M., Cwiklinska H., Raine C.S. and Selmaj K.W. 2014. Brain glycolipids suppress T helper cells and inhibit autoimmune demyelination. *J Neurosci* 34(25): 8646-58.
42. Roark J.H., Park S.H., Jayawardena J., Kavita U., Shannon M. and Bendelac A. 1998. CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells. *J Immunol* 160(7): 3121-7.
43. Fujii S., Shimizu K., Kronenberg M. and Steinman R.M. 2002. Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs. *Nat Immunol* 3(9): 867-74.
44. Hayakawa Y., Takeda K., Yagita H., Van Kaer L., Saiki I. and Okumura K. 2001. Differential regulation of Th1 and Th2 functions of NKT cells by CD28 and CD40 costimulatory pathways. *J Immunol* 166(10): 6012-8.
45. Tomura M., Yu W.G., Ahn H.J., Yamashita M., Yang Y.F., Ono S., Hamaoka T., Kawano T., Taniguchi M., Koezuka Y. and Fujiwara H. 1999. A novel function of Valpha14+CD4+NKT cells: stimulation of IL-12 production by antigen-presenting cells in the innate immune system. *J Immunol* 163(1): 93-101.
46. Oki S., Tomi C., Yamamura T. and Miyake S. 2005. Preferential T(h)2 polarization by OCH is supported by incompetent NKT cell induction of CD40L and following production of inflammatory cytokines by bystander cells in vivo. *Int Immunol* 17(12): 1619-29.
47. Fujii S., Liu K., Smith C., Bonito A.J. and Steinman R.M. 2004. The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J Exp*

- Med* 199(12): 1607-18.
48. Kitamura H., Iwakabe K., Yahata T., Nishimura S., Ohta A., Ohmi Y., Sato M., Takeda K., Okumura K., Van Kaer L., Kawano T., Taniguchi M. and Nishimura T. 1999. The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *J Exp Med* 189(7): 1121-8.
 49. Fujii S., Shimizu K., Okamoto Y., Kunii N., Nakayama T., Motohashi S. and Taniguchi M. 2013. NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic. *Front Immunol* 4: 409.
 50. Terabe M., Swann J., Ambrosino E., Sinha P., Takaku S., Hayakawa Y., Godfrey D.I., Ostrand-Rosenberg S., Smyth M.J. and Berzofsky J.A. 2005. A nonclassical non-Valpha14Jalpha18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance. *J Exp Med* 202(12): 1627-33.
 51. Bai L., Sagiv Y., Liu Y., Freigang S., Yu K.O., Teyton L., Porcelli S.A., Savage P.B. and Bendelac A. 2009. Lysosomal recycling terminates CD1d-mediated presentation of short and polyunsaturated variants of the NKT cell lipid antigen alphaGalCer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(25): 10254-9.
 52. Im J.S., Arora P., Bricard G., Molano A., Venkataswamy M.M., Baine I., Jerud E.S., Goldberg M.F., Baena A., Yu K.O., Ndongue R.M., Howell A.R., Yuan W., Cresswell P., Chang Y.T., Illarionov P.A., Besra G.S. and Porcelli S.A. 2009. Kinetics and cellular site of glycolipid loading control the outcome of natural killer T cell activation. *Immunity* 30(6): 888-98.
 53. Roy K.C., Maricic I., Khurana A., Smith T.R., Halder R.C. and Kumar V. 2008. Involvement of secretory and endosomal compartments in presentation of an exogenous self-glycolipid to type II NKT cells. *J Immunol* 180(5): 2942-50.
 54. Burdin N., Brossay L., Koezuka Y., Smiley S.T., Grusby M.J., Gui M., Taniguchi M., Hayakawa K. and Kronenberg M. 1998. Selective ability of mouse CD1 to present glycolipids: alpha-galactosylceramide specifically stimulates V alpha 14+ NK T lymphocytes. *J Immunol* 161(7): 3271-81.
 55. Schmieg J., Yang G., Franck R.W. and Tsuji M. 2003. Superior protection against malaria and melanoma metastases by a C-glycoside analogue of the natural killer T cell ligand alpha-Galactosylceramide. *J Exp Med* 198(11): 1607-18.

1631-41.

56. Gelin C., Sloma I., Charron D. and Mooney N. 2009. Regulation of MHC II and CD1 antigen presentation: from ubiquity to security. *Journal of Leukocyte Biology* 85(2): 215-24.
57. Brigl M., Bry L., Kent S.C., Gumperz J.E. and Brenner M.B. 2003. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol* 4(12): 1230-7.
58. Tessmer M.S., Fatima A., Paget C., Trottein F. and Brossay L. 2009. NKT cell immune responses to viral infection. *Expert Opin Ther Targets* 13(2): 153-62.
59. Swann J., Crowe N.Y., Hayakawa Y., Godfrey D.I. and Smyth M.J. 2004. Regulation of antitumour immunity by CD1d-restricted NKT cells. *Immunology and Cell Biology* 82(3): 323-31.
60. Shi F.D. and Van Kaer L. 2006. Reciprocal regulation between natural killer cells and autoreactive T cells. *Nat Rev Immunol* 6(10): 751-60.
61. Stanic A.K., Shashidharamurthy R., Bezbradica J.S., Matsuki N., Yoshimura Y., Miyake S., Choi E.Y., Schell T.D., Van Kaer L., Tevethia S.S., Roopenian D.C., Yamamura T. and Joyce S. 2003. Another view of T cell antigen recognition: cooperative engagement of glycolipid antigens by Va14Ja18 natural T(iNKT) cell receptor [corrected]. *Journal of Immunology* 171(9): 4539-51.
62. Ernst W.A., Maher J., Cho S., Niazi K.R., Chatterjee D., Moody D.B., Besra G.S., Watanabe Y., Jensen P.E., Porcelli S.A., Kronenberg M. and Modlin R.L. 1998. Molecular interaction of CD1b with lipoglycan antigens. *Immunity* 8(3): 331-40.
63. Moody D.B., Zajonc D.M. and Wilson I.A. 2005. Anatomy of CD1-lipid antigen complexes. *Nat Rev Immunol* 5(5): 387-99.
64. Yuan W., Qi X., Tsang P., Kang S.J., Illarionov P.A., Besra G.S., Gumperz J. and Cresswell P. 2007. Saposin B is the dominant saposin that facilitates lipid binding to human CD1d molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(13): 5551-6.
65. Kishimoto Y., Hiraiwa M. and O'Brien J.S. 1992. Saposins: structure, function, distribution, and molecular genetics. *Journal of Lipid Research* 33(9): 1255-67.
66. Ciaffoni F., Tatti M., Boe A., Salvioli R., Fluharty A., Sonnino S. and Vaccaro A.M. 2006. Saposin B binds and transfers phospholipids. *Journal of Lipid Research* 47(5): 1045-53.

67. Blomqvist M., Rhost S., Teneberg S., Lofbom L., Osterbye T., Brigl M., Mansson J.E. and Cardell S.L. 2009. Multiple tissue-specific isoforms of sulfatide activate CD1d-restricted type II NKT cells. *Eur J Immunol* 39(7): 1726-35.
68. Girardi E., Maricic I., Wang J., Mac T.T., Iyer P., Kumar V. and Zajonc D.M. 2012. Type II natural killer T cells use features of both innate-like and conventional T cells to recognize sulfatide self antigens. *Nat Immunol* 13(9): 851-6.
69. Patel O., Pellicci D.G., Gras S., Sandoval-Romero M.L., Uldrich A.P., Mallewaey T., Clarke A.J., Le Nours J., Theodossis A., Cardell S.L., Gapin L., Godfrey D.I. and Rossjohn J. 2012. Recognition of CD1d-sulfatide mediated by a type II natural killer T cell antigen receptor. *Nat Immunol* 13(9): 857-63.
70. Shamshiev A., Gober H.J., Donda A., Mazorra Z., Mori L. and De Libero G. 2002. Presentation of the same glycolipid by different CD1 molecules. *J Exp Med* 195(8): 1013-21.
71. Xing G.W., Wu D., Poles M.A., Horowitz A., Tsuji M., Ho D.D. and Wong C.H. 2005. Synthesis and human NKT cell stimulating properties of 3-O-sulfo-alpha/beta-galactosylceramides. *Bioorg Med Chem* 13(8): 2907-16.
72. Fredman P., Mansson J.E., Rynmark B.M., Josefsen K., Ekblond A., Halldner L., Osterbye T., Horn T. and Buschard K. 2000. The glycosphingolipid sulfatide in the islets of Langerhans in rat pancreas is processed through recycling: possible involvement in insulin trafficking. *Glycobiology* 10(1): 39-50.
73. Pernber Z., Richter K., Mansson J.E. and Nygren H. 2007. Sulfatide with different fatty acids has unique distributions in cerebellum as imaged by time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS). *Biochim Biophys Acta* 1771(2): 202-9.
74. Ramstedt B., Leppimäki P., Axberg M. and Slotte J.P. 1999. Analysis of natural and synthetic sphingomyelins using high-performance thin-layer chromatography. *Eur J Biochem* 266(3): 997-1002.
75. Miyamoto K., Miyake S. and Yamamura T. 2001. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* 413(6855): 531-4.
76. Kuns R.D., Morris E.S., Macdonald K.P., Markey K.A., Morris H.M., Raffelt N.C., Banovic T., Don A.L., Rowe V., Burman A.C., Clouston A.D., Farah C.,

- Besra G.S., Illarionov P.A., Smyth M.J., Porcelli S.A. and Hill G.R. 2009. Invariant natural killer T cell-natural killer cell interactions dictate transplantation outcome after alpha-galactosylceramide administration. *Blood* 113(23): 5999-6010.
77. Kang S.J. and Cresswell P. 2004. Saposins facilitate CD1d-restricted presentation of an exogenous lipid antigen to T cells. *Nat Immunol* 5(2): 175-81.
 78. Lennon-Dumenil A.M., Bakker A.H., Wolf-Bryant P., Ploegh H.L. and Lagaudriere-Gesbert C. 2002. A closer look at proteolysis and MHC-class-II-restricted antigen presentation. *Current Opinion in Immunology* 14(1): 15-21.
 79. Hiltbold E.M. and Roche P.A. 2002. Trafficking of MHC class II molecules in the late secretory pathway. *Current Opinion in Immunology* 14(1): 30-5.
 80. Colombo M.P. and Trinchieri G. 2002. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 13(2): 155-68.
 81. Furumoto K., Arai S., Yamasaki S., Mizumoto M., Mori A., Inoue N., Isobe N. and Imamura M. 2000. Spleen-derived dendritic cells engineered to enhance interleukin-12 production elicit therapeutic antitumor immune responses. *International Journal of Cancer* 87(5): 665-72.