

氏名(本籍)	香城諭(石川県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2958号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Dysfunction of T cell receptor AV24AJ18+, BV11+ double-negative regulatory natural killer T cells in autoimmune diseases (自己免疫疾患におけるT細胞受容体 AV24AJ18, BV11 陽性 double-negative 調節性 Natural Killer T細胞の機能不全)
主査	筑波大学教授 医学博士 関沢清久
副査	筑波大学助教授 医学博士 小島寛
副査	筑波大学助教授 医学博士 松井良樹

論文の内容の要旨

(目的)

Natural Killer T (NKT) 細胞は、著しく多様性を欠いたT細胞受容体 (T cell receptor, TCR) を発現すると同時に、NK細胞マーカーであるCD161を共発現する新しいT細胞集団である。通常のT細胞が主要組織適合抗原複合体 (major histocompatibility complex, MHC) に提示されたペプチドを認識しているのに対し、多型性を欠いた抗原提示分子であるCD1d上の脂質・糖脂質抗原を認識することに加え、Th0タイプのサイトカイン産生パターン、強い抗腫瘍活性を有すること等、多くの点で既知のT細胞との相違が認められる。

近年、CD4およびCD8が共に陰性のdouble negative (DN) NKT細胞が強皮症 (systemic sclerosis, SSc)、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus, SLE)、および慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) 等の自己免疫疾患患者において、選択的に減少していることが報告された。また、自己免疫疾患モデルマウスにおいて、NKT細胞移入やNKT細胞を大量に保有するトランスジェニックマウスとの交配によって発症を抑制しうることが報告され、NKT細胞が自己免疫応答における調節性T細胞である可能性が示唆されてきた。

本研究においては、まず、ヒトNKT細胞のV β レパトアを確認することにより、フローサイトメトリーによるヒトNKT細胞特異的検出系を構築し、自己免疫疾患患者末梢血におけるNKT細胞動態を確認する。さらに、自己免疫疾患患者におけるNKT細胞の選択的減少の機序を解明する一資料を得るために、自己免疫疾患患者末梢血NKT細胞の抗原応答性を検討することを目的とした。

(方法)

- 1) Single cell analysis: ヒトNKT細胞のV β レパトアを明らかにするために、単細胞レベルの解析を実施した。健康被験者より末梢血単核球を分離し、Cell sorterによってCD4⁻CD8⁻(DN) TCR AV24⁺ cellを96 well culture plateにclone sortingした。Well内にてcell lysis、およびcDNA合成の後、NKT細胞に特異的なTCR α 鎖であるTCR AV24AJ18の発現をnested PCRおよびsequencingにて確認した。TCR AV24AJ18の発現が認められたcloneに対し、TCR V β レパトアおよびCD161の発現を同様のnested PCRにて確認した。
- 2) 自己免疫疾患患者末梢血におけるNKT細胞動態: 1)の結果に基づき、TCR α および β 鎖に特異的な抗体を

用いてRA (n = 20), SLE (n = 18), SSc (n = 13), Sjögren's syndrome (SS, n = 17) の各自己免疫疾患患者, 健常被験者 (n = 13), および疾患コントロールとして Behcet disease (BD) 患者 (n = 20) の末梢血における NKT 細胞動態をフローサイトメトリーにより検討した。

- 3) 自己免疫疾患患者末梢血 NKT 細胞の抗原応答性: RA (n = 10), SLE (n = 10), SSc (n = 8), SS (n = 9), および健常者 (n = 7) より末梢血単核球を分離し, NKT 細胞特異抗原である合成糖脂質 α -galactosylceramide (α -GalCer) と共に 240 時間培養し, 培養後の NKT 細胞の増殖をフローサイトメトリーにて定量した。
- 4) NKT 細胞抗原不応答機序: 3) において認められた NKT 細胞抗原不応答群 PBMC より, 抗原提示細胞 (APCs: CD3⁻, monocyte gated cells), および NKT 細胞含有分画 (CD4⁻CD8⁻CD20⁻ lymphocyte gated cells) を cell sorter にて分離し, 特異抗原存在下で健常被験者由来の同分画との共培養を行った。
- 5) NKT 細胞のサイトカイン産生プロファイル: 3) において認められた NKT 細胞抗原応答群, および健常者由来の NKT 細胞を α -GalCer と共に 24 時間培養し, 培養後の DNT 細胞分画を Cell sorter にて分離した。分離の後, RNA の抽出および cDNA の合成を行い, nested PCR によって IFN- γ および IL-4 mRNA の発現を確認した。

(結果)

- 1) cDNA の合成が確認された 57 clone 中, 55 clone において NKT 細胞に特異的な TCR α 鎖である TCR AV24AJ18 の発現が確認された。さらに, TCR AV24AJ18⁺ の 55 clone のうち, 96.4% に相当する 53 clone において TCR BV11 の発現を確認し, TCR AV24⁺ BV11⁺ の clone 全てにおいて, NKR-P1A の発現を確認した。
- 2) RA, SLE, SSc, SS の各自己免疫疾患末梢血において, 健常被験者および BD 患者と比較し, 有意な NKT 細胞の減少が確認された (HS: 290 \pm 69.6, RA: 48.8 \pm 10, SLE: 50.6 \pm 12.9, SSc: 80.8 \pm 30.6, SS: 40.0 \pm 11.7, BD: 321.2 \pm 103.4 count/ml of whole blood, P < 0.01)。また, CD4⁺ NKT 細胞においても同様の傾向が認められた。
- 3) 特異抗原との共培養の結果, 健常被験者においてはその全てにおいて DN NKT 細胞の明らかな増殖が認められた。またこの応答は抗 CD1d 抗体によって阻害でき, CD1d 依存性の NKT 細胞応答であることが示された。一方, 自己免疫疾患患者においては, RA (3/10), SLE (5/10), SSc (4/8), SS (6/9) の計 37 名中 18 名においてのみ DN NKT 細胞の抗原依存性の増殖応答が認められた。
- 4) DN NKT 細胞不応答患者由来の APCs と健常被験者由来の DN NKT 細胞含有分画の共培養において, DN NKT 細胞の増殖応答が認められた。一方, 不応答患者由来の DN NKT 細胞分画と健常被験者由来の APCs との共培養においては, DN NKT 細胞の増殖応答は認められなかった。
- 5) α -GalCer 刺激後のサイトカイン産生パターンにおいて, 健常被験者および応答患者間に相違は認められなかった。

(考察)

NKT 細胞におけるクローンレベルの解析の結果, 均一な TCR AV24AJ18 を発現した DN NKT 細胞の 96.4% において, TCR BV11 を発現していることから, 抗 TCR AV24 および抗 TCR BV11 抗体を用いることにより, DN NKT 細胞の 95% 以上を検出可能であることが示された。本検出法によって末梢血中 NKT 細胞動態を検討したところ, 健常者と比較し, 自己免疫疾患患者において明らかな NKT 細胞の減少が確認された。これは先行研究の結果 (mRNA の定量) にも一致したことから, 本検出法が NKT 細胞検出において妥当であると考えられた。

自己免疫疾患患者末梢血における NKT 細胞減少の機序を解明するために, NKT 細胞の抗原応答性を検討した結果, 自己免疫疾患患者においては, 抗原応答群と不応答群の 2 群の存在が確認された。抗原不応答群由来の APCs は, 健常者由来の NKT 細胞を抗原存在下で増殖誘導できたが, その増殖誘導は健常者由来の APC と比較し弱いも

のであった。一方、健常者由来のAPCsによって不応答群由来のNKT細胞を増殖誘導できなかった。これらの点より、不応答群においては、APCsおよびNKT細胞の両者においてなんらかの機能異常が存在する可能性が示唆され、その結果抗原応答不全が導かれていると解釈された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究により、自己免疫疾患患者末梢血においてNKT細胞が選択的に減少していることが示され、NKT細胞があらためて自己免疫応答を制御する調節性T細胞である可能性が示された。また、自己免疫疾患患者由来のNKT細胞、および抗原提示細胞の両者において機能異常の存在を示唆する結果が得られ、これらの機能異常が自己免疫疾患患者におけるNKT細胞減少の一因となる可能性が示唆された。自己免疫疾患発症機序解明に重要な示唆をあたえる優れた研究と考えられる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。