

氏 名 (本籍)	吉 賀 洋 平 (大 分 県)		
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)		
学 位 記 番 号	博 甲 第 5469 号		
学位授与年月日	平成 22 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	人間総合科学研究科		
学 位 論 文 題 目	<b>Functional analysis of invariant NKT cells in autoimmune arthritis</b> (自己免疫性関節炎における iNKT 細胞の機能解析)		
主 査	筑波大学教授	博士 (医学)	澁 谷 彰
副 査	筑波大学教授	医学博士	二 宮 治 彦
副 査	筑波大学准教授	医学博士	石 井 幸 雄
副 査	筑波大学講師	博士 (医学)	柳 澤 和 彦

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

自己免疫性関節炎における NKT 細胞の機能を明らかにし、NKT 細胞をターゲットとした治療モデルを確立する。

① コラーゲン誘導性関節炎モデル (collagen-induced arthritis : CIA) における NKT 細胞の機能を明らかにする。

② NKT 細胞からの選択的な IFN- $\gamma$  産生を誘導する合成糖脂質抗原 :  $\alpha$ -carba-GalCer を用いて関節炎の抑制を試みる。

### (方法)

① 1) NKT-KO マウスおよび C57BL/6 (WT) マウスに type II collagen (CII) を免疫することにより CIA を誘導し、関節炎の重症度を測定した。 2) CII 免疫後 10 日目の所属リンパ節細胞を in vivo で CII 再刺激し、CII-特異的な T 細胞応答を ELISA 法および FACS 解析により測定した。 3) NKT 細胞からの IL-17 産生の有無を確認するため、代表的な NKT 細胞抗原である  $\alpha$ -GalCer で NKT 細胞を刺激し、IL-17 産生を測定した。 4) NKT 細胞における IL-23R および ROR $\gamma$ T の発現を RT-PCR で確認した。また、NKT 細胞を IL-23 存在下で培養し、産生される IL-17 を ELISA 法で測定した。NKT 細胞は、NK1.1 陽性、陰性集団に分けて IL-23 の依存性を確認した。

② 1)  $\alpha$ -carba-GalCer の作用を確認するため、 $\alpha$ -carba-GalCer を i.v. 投与し、誘導される血中のサイトカインを ELISA 法で測定した。In vitro においては、NKT 細胞を数%含む脾細胞を  $\alpha$ -carba-GalCer で刺激し、培養上清中に産生されるサイトカインを ELISA 法で測定した。 2)  $\alpha$ -carba-GalCer を CII と共に免疫し、CIA 発症に与える影響を測定した。Anti-IFN- $\gamma$  中和抗体は、 $\alpha$ -carba-GalCer 投与時に、i.p. 投与した。 3)  $\alpha$ -carba-GalCer/CII 免疫後 10 日目の所属リンパ節を in vitro で CII 再刺激し、CII-特異的な T 細胞応答を ELISA 法を用いて測定した。 4)  $\alpha$ -carba-GalCer/CII 免疫後 35 日目に、血中の抗 CII 抗体価を ELISA 法を用いて測定した。 4)  $\alpha$ -carba-GalCer/CII 免疫後 10 日目の所属リンパ節の抑制性 T 細胞数、活性化 T 細胞数および T 細胞のアポトーシスを FACS を用いて測定した。

## (結果)

① 1) NKT-KO マウスの関節炎の重症度は WT に比して軽度であった。 2) NKT-KO マウスにおける抗原 (type II collagen) 特異的な T 細胞応答において IL-17 の産生低下および Th17 細胞の減少を認めた。 3) in vitro の解析から、NKT 細胞を  $\alpha$ -GalCer で刺激することにより IL-17 が産生された。 4) NKT 細胞は Th17 細胞同様に IL-23R/ROR $\gamma$ T を発現しており、IL-23/IL-23R を介した刺激によっても IL-17 を産生しうることが示された。また、IL-17 産生 NKT 細胞は、NK1.1 陰性 NKT 細胞集団であった。

② 1) 合成糖脂質  $\alpha$ -carba-GalCer は、in vivo/in vitro において選択的に IFN- $\gamma$  産生を誘導した。 2)  $\alpha$ -carba-GalCer を投与することで、CIA の重傷度が低下した。また、anti-IFN- $\gamma$  中和抗体を投与することで、 $\alpha$ -carba-galCer による関節炎抑制効果は、消失した。 3) 抗原特異的な T 細胞応答を解析した結果、 $\alpha$ -carba-GalCer 投与群において、T 細胞の増殖能の低下および IFN- $\gamma$ /IL-17 の産生低下を認めた。 4)  $\alpha$ -carba-GalCer 投与群において優位な抗 CII 抗体産生低下を認めた。 5)  $\alpha$ -carba-GalCer 投与群における抑制性 T 細胞、活性化 T 細胞数、アポトーシス細胞数は、コントロール処理群と優位な差を認めなかった。

## (考察)

① NKT 細胞は、関節炎発症において、pathogenic な Th17 細胞の誘導または活性化をサポートするのみならず、自身 (特に NK1.1 陰性 NKT 細胞) も糖脂質抗原や IL-23 を認識して活性化することで IL-17 産生細胞として関節炎発症に寄与する可能性が示された。

②  $\alpha$ -carba-GalCer は、NKT 細胞を活性化し、選択的に IFN- $\gamma$  を誘導することで、自己抗原反応性 T 細胞および B 細胞応答を抑制し、CIA の重症度を軽減させた。

しかし、 $\alpha$ -carba-GalCer 投与によつて、抑制性 T 細胞や活性化 T 細胞数、アポトーシス細胞数に影響をあたえることはなく、他のメカニズムよつて T 細胞応答を制御していることが考えられる。

## (結語)

自己免疫性関節炎モデルにおいて、NKT 細胞は、effector 細胞として機能するが、合成糖脂質抗原を用いて、そのサイトカン産生をコントロールすることにより関節炎を抑制する suppressor 細胞として機能させることが可能である。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、自己免疫性関節炎において NKT 細胞から IL-17 が産生されることを明らかにし、その産生を制御することによつてその病態が改善することを示した学術的に極めて価値の高いものである。

よつて、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。