

氏名(本籍)	ほり こし まさ のぶ 堀 越 正 信 (茨城県)			
学位の種類	博 士 (医 学)			
学位記番号	博 甲 第 6625 号			
学位授与年月日	平成 25 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>Activation of invariant NKT cells with glycolipid ligand  <math>\alpha</math>-galactosylceramide ameliorates glucose-6-phosphate isomerase  peptide-induced arthritis</b> (糖脂質リガンドを用いた NKT 細胞の活性化によるグルコース-6-リン酸イソメラーゼペプチド誘導性関節炎の制御)			
主査	筑波大学教授	博士(医学)	檜 澤 伸 之	
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	洪 谷 和 子	
副査	筑波大学講師	博士(医学)	鈴 川 和 己	
副査	筑波大学講師	博士(医学)	三 島 初	

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

#### (目的)

invariant natural killer T 細胞 (iNKT 細胞) は natural killer 細胞と T 細胞両者の細胞表面マーカーを併せ持つ細胞である。レパトワの限られた T 細胞受容体を持ち、糖脂質を抗原として認識・活性化することで Th1, Th2, Th17 タイプの多種多様なサイトカインを産生するユニークな性質を持つ。iNKT 細胞を代表的な糖脂質抗原である  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) を用いて活性化することで、1 型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチなど種々の自己免疫疾患のマウスモデルにおいて病態が制御されることが報告されている。関節リウマチのモデルであるコラーゲン誘導関節炎においても  $\alpha$ -GalCer やその類縁体投与により iNKT 細胞を活性化すると関節炎が軽減することが示されている。しかしその機序については未だ明らかにはされていない。glucose-6-phosphate isomerase (GPI) は K/BxN マウスの自然発症関節炎の自己抗原として同定された分子であり、DBA1 マウスに GPI の蛋白あるいは T 細胞エリートペプチドを免疫することで関節炎を誘導できる。この GPI 誘導性関節炎は TNF- $\alpha$  や IL-6 などの分子標的治療への反応性・CD4 陽性 T 細胞への依存性がヒトの関節リウマチに類似していることが報告されている。今回この GPI 誘導性関節炎を用いて  $\alpha$ -GalCer で活性化した iNKT 細胞が関節炎の病態に与える影響、及びその機序を明らかにすることを研究の目的とした。

#### (対象と方法)

GPI ペプチドを DBA1 マウスの尾部に皮内投与することで免疫 8 日目頃から関節炎が発症し、14 ~ 18 日目頃にピークとなり以降は自然軽快する。

①  $\alpha$ -GalCer を GPI ペプチドと共に同時に DBA1 マウスの尾部に皮内投与し、関節炎の程度を肉眼的スコアリングと足関節腫脹の測定により評価した。コントロール群のマウスには  $\alpha$ -GalCer の溶媒である DMSO を投与した。また関節炎発症後の免疫 10 日目に  $\alpha$ -GalCer を皮内投与する治療的実験も行った。

②免疫部位の所属リンパ節である鼠径リンパ節に iNKT 細胞が存在するかをフローサイトメーターにより評価した。

③抗原に対する B 細胞の応答を評価するため、免疫 28 日目の血清抗 GPI 抗体を ELISA 法により検出した。

④免疫 10 日目にマウスから単離した鼠径リンパ節から CD4 陽性 T 細胞を採取し in vitro で抗原提示細胞 (antigen presenting cells : APC) との共培養下に抗原再刺激に対するサイトカイン産生をみた。

⑤ in vitro において CD4 陽性 T 細胞及び APC から iNKT 細胞をフローサイトメーターによって除去し、④と同様に APC との共培養下に抗原再刺激に対するサイトカイン産生をみた。

①～⑤の実験は全て n=4～5 で行った。

#### (結果)

①  $\alpha$ -GalCer を抗原と共に投与したマウスでは有意に関節炎の肉眼的スコアが低下し、足関節の腫脹の程度も軽減していた。関節炎発症後の投与では関節炎抑制効果は認められなかった。

②  $\alpha$ -GalCer を抗原と共に投与することで鼠径リンパ節に有意に iNKT 細胞の増殖を認めた。

③  $\alpha$ -GalCer を投与したマウスでは血清抗 GPI 抗体価が total IgG, IgG1, IgG2b において有意に低下していた。

④ In vitro での抗原再刺激に対する CD4 陽性 T 細胞からのサイトカイン産生は IL-17, IFN $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  いずれにおいても有意な低下を認めた。 $\alpha$ -GalCer 投与マウス由来の CD4 陽性 T 細胞はコントロールマウス由来の APC と共培養してもサイトカイン産生は抑制されていた。

⑤ in vitro で iNKT 細胞を除去しても  $\alpha$ -GalCer 投与マウス由来の CD4 陽性 T 細胞からのサイトカイン産生 (IFN $\gamma$ , IL-17) は同様に抑制されていた。

#### (考察)

$\alpha$ -GalCer の投与により抗原の提示部位である所属リンパ節に iNKT 細胞が増殖し、抗原特異的 T 細胞・B 細胞応答が抑制され、関節炎の重症度が軽減されることが示された。In vitro では iNKT 細胞は抗原特異的 T 細胞に対して直接の制御能を持たず、また関節炎発症後の投与では効果がみられなかったことから  $\alpha$ -GalCer で活性化した iNKT 細胞は in vivo において免疫後早期に抗原特異的 T 細胞の誘導を抑制して関節炎抑制効果を発揮すると考えられた。

#### (結論)

$\alpha$ -GalCer により活性化した iNKT 細胞は抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の誘導抑制を介して GPI ペプチド誘導性関節炎を制御することが示唆された。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は現在ヒトの関節リウマチの病態に最も近いと考えられる GPI 誘導関節炎モデルを用いて、糖脂質抗原によって活性化した NKT 細胞の関節炎の病態に与える影響を検討したものである。NKT 細胞の活性化によって抗原特異的な T 細胞・B 細胞応答の抑制と関節炎の軽減が認められた。本研究で観察された炎症抑制効果の詳細なメカニズムの解明にはさらなる検討を要するが、将来 NKT 細胞が関節リウマチの治療ターゲットになりうる可能性を示した重要な研究である。

平成 25 年 1 月 9 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

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。