

学 位 論 文 題 名

炎症性腸疾患患者の末梢血単核球における  
抑制性 NK レセプター発現細胞動態の検討

Analysis of inhibitory NK cell receptors on PBMC  
in patients with inflammatory bowel disease.

学位論文内容の要旨

[緒言]炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease, 以下 IBD と略す)とは, 慢性の原因不明の難治性腸疾患を総称する言葉であり, おもに潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis, 以下 UC と略す)とクローン病(Crohn's disease, 以下 CD と略す)のことを指す. これらは異なる疾患群と考えられており, UC においては T リンパ球や B リンパ球の機能異常と Th2 タイプの炎症の関与が, CD では単球やマクロファージ系の機能異常と Th1 タイプの炎症の関与が考えられている. 抑制性 NK レセプターは本来ナチュラルキラー(NK)細胞に発現しており, 自己の MHC-class I 分子を認識してその傷害活性を抑制する方に働く. 抑制性 NK レセプターには大きく分けて c-type lectin superfamily に属するものと immunogloblin superfamily に属するものの 2 種類がある. CD94/NKG2A は c-type lectin superfamily に属し, HLA-E を認識して抑制性シグナルを伝える. HLA-E の発現量は MHC class I 全体の翻訳量を反映し, 標的細胞上の MHC class I 発現をモニターすることが出来る. CD158b は immunogloblin superfamily に属し, 主に HLA-C 抗原を認識して細胞傷害を抑制する. 自己の MHC class I 発現の減弱したウイルス感染細胞や腫瘍細胞に対して, これらを排除する機構の中で重要な位置を占めるものと考えられている. 最近, これらの抑制性 NK レセプターは, CD8+T リンパ球上にも発現していることが明らかにされ, 自己免疫疾患や原因不明の慢性炎症性疾患の発症を抑制している可能性が指摘されているが, 炎症性腸疾患をはじめとする原因不明の慢性炎症性疾患あるいは自己免疫疾患の患者において, T リンパ球上の抑制性 NK レセプターを検討した報告はいまだ見られない. 本研究では IBD 患者末梢血 T リンパ球において, 代表的な抑制性 NK レセプターである CD94/NKG2A および CD158b の発現を検討した.

[方法]50 歳未満の UC 患者 19 名, CD 患者 16 名, および健常人 (以下 HC と略す) 8 名を対象とした. 患者および健常人よりヘパリン加末梢静脈血を採取し, これを分離して得られた単核球を Hanks 液に浮遊させ, Fluorescein isothiocyanate (FITC)で標識された CD3 抗体,あるいは Phycoerythrin (PE)で標識された CD94/NKG2A, CD158b 抗体を用いて 4℃

で 20 分間染色し、フローサイトメトリーにて計測した。次にリンパ球上に CD94/NKG2A を誘導するサイトカインとして知られている IL-15 に対する反応性を検討した。あらかじめ抗 CD3 抗体で固着化したプレート内で、1 well あたり  $1 \times 10^6$  の各疾患群の分離単核球細胞を、10% fetal calf serum を加えた RPMI1640 培地 1ml に浮遊させ、IL-15 5ng を加え、5%CO<sub>2</sub>-incubator を用いて 37°C で 7 日間培養した。培養後の細胞を  $2 \cdot 10 \times 10^6$  に調整して Hanks 液に浮遊させ、PE で標識された抗 NKG2A および抗 CD94 抗体、FITC で標識された抗 CD3 および CD8 抗体を用いて 4°C で 20 分間染色し、フローサイトメトリーにて CD94/NKG2A+CD3/CD8+T リンパ球を測定した。

[結果]CD94+CD3+細胞の割合は、UC 群、CD 群のいずれも HC 群との間に有意差はみられなかった。NKG2A+CD3+細胞の割合は、HC 群では  $3.4 \pm 2.1(2.9)\%$ 、UC 群では  $1.7 \pm 1.7(1.0)\%$ 、CD 群では  $2.4 \pm 2.8(0.9)\%$  であり、HC 群に比し、UC 群において有意に減少していた。CD158b+CD3+細胞の割合は、UC 群、CD 群のいずれも HC 群との差はみられなかった。UC 群における活動部位別検討では、左側結腸型と全結腸型で、NKG2A+CD3+細胞の割合は、HC 群に対して有意な低下が見られた。活動性別検討では UC 群の活動期・非活動期を問わずに NKG2A+CD3+細胞の割合は HC 群に対して有意な低下が見られた。次に、UC 群において CD94/NKG2A 陽性 T リンパ球が低下している原因を明らかにするため、T リンパ球上に CD94/NKG2A を誘導するサイトカインである IL-15 に対する反応性を検討した。IL-15 刺激後の CD94+CD3+細胞の割合は、HC 群では  $30.8 \pm 7.6(32.6)\%$ 、UC 群では  $23.2 \pm 5.5(21.3)\%$ 、CD 群では  $24.6 \pm 1.2(25.0)\%$  であり、UC 群において IL-15 による反応が有意に減少していた。NKG2A+CD3+細胞の割合は、HC 群では  $25.6 \pm 7.5(26.3)\%$ 、UC 群では  $16.3 \pm 5.3(15.8)\%$ 、CD 群では  $20.2 \pm 1.6(21.0)\%$  であり、UC 群において有意に減少していた。CD94+CD8+細胞の割合は、有意ではないものの HC 群に比して UC 群で減少している傾向がみられた。NKG2A+CD8+細胞の割合は、HC 群では  $19.6 \pm 6.4(20.3)\%$ 、UC 群では  $13.1 \pm 4.8(11.2)\%$ 、CD 群では  $15.2 \pm 1.8(15.0)\%$  であり UC 群において有意に減少していた。UC の病変部位別検討では、左側結腸型および全結腸型において IL-15 に対する NKG2A+CD3+細胞発現の有意な低下がみられた。ステロイドホルモン(SH)使用の影響および疾患活動性との関連性の検討では、HC 群と比較して SH 使用群、活動性の群で IL-15 刺激に対する CD94/NKG2A+CD3+細胞の割合の有意な低下がみられた。

[考察]IL-15 は従来 NK 細胞の分化に重要なサイトカインと考えられてきたが、最近では T リンパ球上の NK レセプターの発現や、CD8+メモリー T リンパ球の増殖維持にも重要であることが明らかにされつつある。本研究結果から、UC 患者では IL-15 刺激に対して CD94/NKG2A の発現に異常があるために T リンパ球の抑制性機能を低下させ、粘膜上皮での傷害を制御できないという可能性が示唆された。またこの T リンパ球の機能異常が本疾患の重要な病因の 1 つである可能性も示唆される。しかしながら、IL-15 刺激に対して CD94/NKG2A が誘導されにくいメカニズムや、大腸粘膜局所での CD94/NKG2A 発現状態など明らかにしなければならない点も多く、今後さらなる検討が必要と思われた。

[結語]今回の検討において、①潰瘍性大腸炎患者において NKG2A 発現末梢血 T リンパ球が減少していること、②潰瘍性大腸炎患者において IL-15 刺激による NKG2A および CD94

の発現末梢血 T リンパ球の減弱がみられること、③これらの異常は疾患の活動性、非活動性を問わずに認められること、が示された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 吉 木 敬

## 学 位 論 文 題 名

### 炎症性腸疾患患者の末梢血単核球における 抑制性 NK レセプター発現細胞動態の検討

Analysis of inhibitory NK cell receptors on PBMC  
in patients with inflammatory bowel disease.

炎症性腸疾患(IBD)とは、原因不明の慢性難治性腸疾患を総称する言葉で、主に潰瘍性大腸炎(UC)と CD 群(CD)のことを指す。抑制性 NK レセプターは本来ナチュラルキラー(NK)細胞に発現しており、自己の MHC・class I 分子を認識してその傷害活性を抑制する方に働く。抑制性 NK レセプターには大きく分けて c-type lectin superfamily に属するものと immunoglobulin superfamily に属するものの 2 種類があり、CD94/NKG2A は c-type lectin superfamily に属し、HLA-E を認識して抑制性シグナルを伝える。HLA-E の発現量は MHC class I 全体の翻訳量を反映し、標的細胞上の MHC class I 発現をモニターすることが出来る。CD158b は immunoglobulin superfamily に属し、主に HLA-C 抗原を認識して細胞傷害を抑制する。自己の MHC class I 発現の減弱したウイルス感染細胞や腫瘍細胞に対して、これらを排除する機構の中で重要な位置を占めるものと考えられている。最近、これら抑制性 NK レセプターは、CD8+T リンパ球上にも発現していることが明らかにされ、自己免疫疾患や原因不明の慢性炎症性疾患の発症を抑制している可能性が指摘されているが、実際に検討した報告は見られない。本研究では IBD 患者末梢血 T リンパ球において、代表的な抑制性 NK レセプターである CD94/NKG2A および CD158b の発現と、T リンパ球上に CD94/NKG2A を誘導するサイトカインである IL-15 に対する反応性をフローサイトメトリーにより検討した。HC 群に対し、NKG2A+CD3+細胞の割合は UC 群で有意に減少しており、活動部位別検討では左側結腸型と全結腸型で、有意な低下が見られた。活動性別検討では UC 群の活動期・非活動期を問わずに有意な低下が見られた。T リンパ球上に CD94/NKG2A を誘導するサイトカインである IL-15 に対する反応性を検討した。IL-15 刺激後の CD94+CD3+細胞、NKG2A+CD3+細胞、NKG2A+CD8+細胞の割合は HC 群に対して UC 群において有意に減少していた。UC の病変部位別検討では、左側結腸型および全結腸型において IL-15 に対する NKG2A+CD3+細胞発現の有意な低下がみられた。ステロイドホルモン(SH)使用の影響および疾患活動性との関連性の検討では、HC 群と比較して SH 使

用群、活動性の群で IL-15 刺激に対する CD94/NKG2A+CD3+細胞の割合の有意な低下がみられた。今回の検討において、潰瘍性大腸炎患者では NKG2A 発現末梢血 T リンパ球が減少していること、IL-15 刺激による NKG2A および CD94 の発現末梢血 T リンパ球の減弱がみられること、これらの異常は疾患の活動性、非活動性を問わずに認められることを示した。

口頭発表後、副査小池教授から、抑制性 NK レセプター発現細胞数が減ることと機能異常に関する文献的知見について、IL-15 のレセプターが機能異常を有する可能性について、IL-15 の発現部位について、抑制性 NK レセプターや IL-15 に関する動物モデルについて、NK T 細胞との関連性についての質問があった。申請者は機能異常に関する知見は明らかにされていないこと、IL-15 のレセプターが機能異常を有する可能性は今後検討すること、IL-15 は腸管上皮などで発現すること、抑制性 NK レセプターに関する動物モデルはなく、IL-15 transgenic mouse で小腸炎がおきること、NKT 細胞は大部分が CD8+であり今回の細胞とは異なることを回答した。次いで、副査吉木教授から、調べた細胞の絶対数についての質問があり、申請者は絶対数は調べていないことを回答した。吉木教授からは抑制性 NK レセプター発現細胞の機能も調べるべきであること、局所での発現細胞についても調べるべきであるとの提言が成された。さらに、主査浅香教授から、UC の病変部位による差について、CD 群での活動性別検討について、治療への展望についてに関する質問があった。申請者は直腸炎型でステロイド投与が多く症例数も少ないため断言できないこと、CD 群での検討は十分行っていないこと、潰瘍性大腸炎の病因であるならば直接治療に結びつくことと回答した。最後に主査浅香教授が、今後の検討項目の確認を行って公開発表を修了した。

本研究結果から、UC 患者では IL-15 刺激に対して CD94/NKG2A の発現に異常があるために T リンパ球の抑制性機能を低下させ、粘膜上皮での傷害を制御できないという可能性と、この T リンパ球の機能異常が本疾患の重要な病因の 1 つである可能性が示唆された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。