

学位論文題名

Immuno-regulatory defects of $V\alpha 24^+ V\beta 11^+$ NKT cells in development of Wegener's granulomatosis and Relapsing polychondritis

(Wegener 肉芽腫症および反復性多発性軟骨炎における $V\alpha 24^+ V\beta 11^+$ NKT 細胞の機能異常)

学位論文内容の要旨

はじめに

Wegener 肉芽腫症 (WG) は、上気道と肺の壊死性肉芽腫性病変、全身性壊死性血管炎、巣状壊死性糸球体腎炎を 3 主徴とする全身性疾患である。抗好中球細胞質抗体 (anti-neutrophil-cytoplasmic-antibody) は活動期の WG において陽性で、病因の重要素と考えられているが、病態との関わりについては不明な部分が多い。サイトカインバランスについては、既に、末梢血、局所共に Th1 優位な疾患であることが明らかになっている。

反復性多発性軟骨炎 (RP) は、耳介や気道を中心に全身の軟骨組織が系統的に炎症を起こし、破壊されてゆく予後不良の疾患である。慢性関節リウマチの関連疾患とする報告もあるが、原因は不明である。

NKT 細胞は、T 細胞, B 細胞, NK 細胞に続く第 4 のリンパ球として同定された。T 細胞がペプチドを認識するのに対して、NKT 細胞は糖脂質をリガンドとしている。特に海綿より抽出された α -ガラクトシルセラミド (GalCer) は、NKT 細胞刺激活性が強いことが知られている。

NKT 細胞はまた、その T 細胞レセプター (TCR) の多様性が非常に少ない細胞である。

ヒト NKT 細胞では、TCR の α 鎖は単一の $V\alpha 24$ 遺伝子でコードされており、 β 鎖はその多くが $V\beta 11$ で構成されている。また、NKT 細胞への α -GalCer の提示は、抗原提示細胞 (APC) 上の CD1d 分子と呼ばれる、MHC クラス I 様の分子によるという特徴がある。

NKT 細胞は、刺激によって IL-4, IFN- γ 等のサイトカインを速やかに且つ多量に分泌する。このため、NKT 細胞は、分泌するサイトカインによって、獲得免疫における T 細胞反応の質 (Th1, Th2) を調節すると考えられている。

近年、慢性関節リウマチ (RA) 等の自己免疫疾患において、NKT 細胞が減少していることが報告され、これがサイトカインバランスに影響を及ぼし、疾患発症の一因となっている可能性が提唱されている。本研究では、WG, RP 患者、および健常者における NKT 細胞の割合、および機能解析を行い、これらの疾患における NKT 細胞を介する制御機構について検討を行った。

方法と結果

1. フローサイトメトリーを用いて、WG と RP 患者末梢血中の CD4, CD8 ダブルネガティブ

ブ(DN), CD4⁺ NKT 細胞 (V α 24⁺V β 11⁺CD3⁺)の割合、リンパ球中の頻度を健常者と比較した。また、最近特に CD1d 拘束性の NKT 細胞が、自己免疫疾患の病態制御に重要であるとする報告があり、今回、CD1d- α -GalCer テトラマーを用いて CD1d 拘束性の NKT 細胞の検討も併せて行った。

血中の DN NKT 細胞、CD4⁺ NKT 細胞 (V α 24⁺V β 11⁺CD3⁺)は、いずれも WG および RP 患者群において有意な減少が認められた。CD1d 拘束性の NKT 細胞においても同様に、患者群において、明らかな減少が認められた。

2. WG と RP 患者の免疫学的病態を検討するため、患者群、健常者の末梢血中の CD4⁺ T 細胞の細胞内サイトカイン解析を行った。健常者と患者の CD4⁺ T 細胞の中で、IFN- γ 陽性細胞 (Th1 type)と、IL-4 陽性細胞 (Th2 type) の比を IFN/IL4 として算出し、各群間で差を検討したところ、WG と RP 患者において有意に Th1 優位となっていた。更に、NKT 細胞が CD4⁺ T 細胞のサイトカインバランスにどのような影響を与えているかを解析するため、CD4⁺ NKT 細胞の細胞内サイトカイン解析を行った。NKT 細胞のサイトカインバランスを健常者、寛解期の患者群、活動期の患者群の 3 群に分けて検討したところ、寛解期の WG 患者において、NKT 細胞は有意に Th2 優位となっていた。活動期の患者群においては Th1 優位の傾向があり、NKT 細胞が、産生するサイトカインを介して病態を制御している可能性が示唆された。

3.自己免疫疾患における NKT 細胞の減少の原因を明らかにする為、以下の検討を行った。

APC 上の CD1d 分子の発現低下の有無を確認する為、末梢血 B 細胞、単球上の CD1d 分子の発現を、フローサイトメトリーを用いて解析した。また、患者群における NKT 細胞の α -GalCer に対する反応性を解析するために、健常者と患者の末梢血単核球を α -GalCer、IL-2 と 10 日間共培養を行い、NKT 細胞の反応性増殖の有無について検討した。

WG 患者においては、B 細胞、単球いずれにおいても CD1d 分子の明らかな発現低下は認められなかった。これに対して、RP 患者の単球上における CD1d 分子の発現は、健常者に比し低下が認められた。 α -GalCer 刺激後、健常者では 8 例中 6 例で DN NKT 細胞の有意な増殖が認められた。これに対して患者群で NKT 細胞の有意な増殖反応が見られたものは、RP 患者では 9 例中 2 例、WG 患者では 10 例中 2 例のみであった。また、NKT 細胞の反応性増殖がみられなかったものでは、NKT 細胞中の CD1d- α -GalCer テトラマー陽性分画、すなわち CD1d 拘束性のポピュレーションが有意に減少していた。

考察

自己免疫疾患における NKT 細胞の選択的減少については、これまで SLE, RA 等の疾患において確認されている。今回 WG, RP 患者において検討したが、NKT 細胞は DN, CD4⁺ 亜群いずれにおいても健常者に比し減少していた。また、CD1d- α -GalCer-テトラマー陽性細胞においても減少が確認され、 α -GalCer 反応性の NKT 細胞が減少していると考えられた。NKT 細胞は、早期に大量にサイトカインを産生するため、T 細胞のサイトカインバランスを調節する働きがあると考えられている。今回の検討で、寛解期の患者群と活動期の患者群間において、CD4⁺ NKT 細胞のサイトカインバランスに変化がみられた。従って、自然免疫系の細胞である NKT 細胞が、体内のサイトカインバランスに変化を及ぼし、Th1 優位な疾患である WG, RP の病態に影響している可能性が示唆された。特に患者群において、 α -GalCer 刺激で NKT 細胞が増殖しない無反応群が多くみられた。これら無反応群では、NKT 細胞の α -GalCer, CD1d への結合が悪いために、 α -GalCer に反応しないと考

られる。また、無反応群における NKT 細胞の減少は、 α -GalCer 反応性の NKT 細胞の正の選択過程が障害されている可能性が、APC 上の CD1 発現の解析より示唆された。

本研究により、NKT 細胞が WG, RP において選択的に減少していると同時に、機能異常を示すことが判明した。また、これらの異常は、CD1d- α -GalCer-テトラマー陽性 NKT 細胞の選択的減少によると考えられ、これら疾患の病態形成に影響していることが示唆された。

最近 NKT 細胞を Th2 に偏位・調節するリガンドによる、自己免疫疾患モデルマウスの治療が報告されている。ヒト自己免疫疾患治療に対しても、NKT 細胞の機能修飾の応用が、今後重要と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 福 田 諭
副 査 教 授 小 野 江 和 則

学 位 論 文 題 名

Immuno-regulatory defects of $V\alpha 24^+ V\beta 11^+$ NKT cells in development of Wegener's granulomatosis and Relapsing polychondritis

(Wegener 肉芽腫症および反復性多発性軟骨炎における
 $V\alpha 24^+ V\beta 11^+$ NKT 細胞の機能異常)

Wegener 肉芽腫症 (WG) は、上気道と肺の壊死性肉芽腫性病変、全身性壊死性血管炎、巣状壊死性糸球体腎炎を 3 主徴とする全身性疾患である。抗好中球細胞質抗体が病因の重要素と考えられているが、病態との関わりについては不明な部分が多い。反復性多発性軟骨炎 (RP) は、耳介や気道を中心に全身の軟骨組織が系統的に炎症を起こし、破壊されてゆく予後不良の疾患である。慢性関節リウマチの関連疾患とする報告もあるが、原因は不明である。NKT 細胞は、T 細胞、B 細胞、NK 細胞に続く第 4 のリンパ球として同定された。T 細胞がペプチドを認識するのに対して、NKT 細胞は糖脂質をリガンドとしている。特に海綿より抽出された α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer) は、NKT 細胞刺激活性が強いことが知られている。近年、自己免疫疾患において、NKT 細胞が減少していることが報告され、これがサイトカインバランスに影響を及ぼし、疾患発症の一因となっている可能性が提唱されている。

申請者は、WG, RP 患者、および健常者における $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ NKT 細胞、CD1d 拘束性の NKT 細胞の割合、CD4⁺T 細胞、NKT 細胞のサイトカイン産生能の解析を行った。また、患者群における NKT 細胞の減少の原因を明らかにするため、抗原提示細胞 (APC) 上の CD1d 分子の発現、NKT 細胞の α -GalCer に対する反応性を解析した。その結果、血中の DNNT 細胞、CD4⁺NKT 細胞は、健常者と比べいづれも患者群において有意な減少が認められた。CD1d 拘束性の NKT 細胞においても同様に、患者群において、明らかな減少が認められた。また、CD4⁺T 細胞のサイトカインバランスは、患者群に

において有意に Th1 に偏位していた。NKT 細胞のサイトカインバランスの検討では、寛解期の WG 患者において、有意に Th2 優位となっていた。活動期の患者群においては Th1 優位の傾向がみられた。以上の結果から、自然免疫系の細胞である NKT 細胞が、体内のサイトカインバランスに変化を及ぼし、Th1 優位な疾患である WG, RP の病態に影響している可能性が示唆された。次に、APC 上の CD1d 分子の発現について解析したところ、RP 患者の単球上における CD1d 分子の発現が、健常者に比し低下していた。WG 患者においては、B 細胞、単球いずれにおいても CD1d 分子の明らかな発現低下は認められなかった。また、 α -GalCer 刺激後、健常者では殆どの症例で NKT 細胞の有意な増殖が認められた。これに対して、患者群においては、NKT 細胞の有意な増殖反応は殆ど認められなかった。また、NKT 細胞の反応性増殖がみられなかったものでは、NKT 細胞中の CD1d 拘束性のポピュレーションが有意に減少していた。以上の結果より、患者群においては、CD1d 拘束性ポピュレーションの減少、または NKT 細胞の α -GalCer、CD1d への結合能低下のために、 α -GalCer に反応しないと考えられた。また、無反応群における NKT 細胞の減少については、 α -GalCer 反応性の NKT 細胞の正の選択過程が障害されている可能性が、APC 上の CD1d 発現の解析より示唆された。

口頭発表後、副査の福田教授から、治療による NKT 細胞への影響について、病状と NKT 細胞の関連について、アレルギー性疾患における NKT 細胞の役割について、副査の小野江教授から、自己抗体、補体系と NKT 細胞の関連について、主査の上出教授から、WG の組織像と NKT 細胞の関連について、好中球、ケモカインとの関連について質問がなされた。申請者は自身の研究結果、あるいは文献的知識に基づいて、誠実かつ、概ね適切に回答し得た。

本研究により、WG, RP において、NKT 細胞の数的、機能的異常がみられること、また NKT 細胞が病態に影響を及ぼしていることが判明し、今後の WG, RP の病因、病態解明に、示唆と方向性を与えた点が高く評価された。

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。