

# インターロイキン-21処理樹状細胞によって刺激された NKT 細胞のインターフェロン- $\gamma$ 産生増強効果

## 学位論文内容の要旨

### 【背景と目的】

NKT 細胞は、NK 細胞および T 細胞の機能を併せ持ち、自然免疫および獲得免疫の制御に深く関与している。NKT 細胞は、抗原提示細胞上の CD1d に結合した  $\alpha$ -ガラクトシルセラミド ( $\alpha$ -GalCer) などの脂質抗原により活性化され、T ヘルパー I 型 (Th1) である IFN- $\gamma$  および Th2 サイトカイン である IL-4 などを迅速かつ多量に産生する。樹状細胞 (dendritic cells, DC) は強力な抗原提示細胞であり、T 細胞のみならず NKT 細胞も強く活性化し、種々のサイトカイン産生を誘導する。従って、DC 刺激による NKT 細胞からのサイトカイン産生制御は、今後 I 型アレルギー反応の制御を含めた種々の臨床応用に資すると思われる。

近年同定された IL-21 は、CD4<sup>+</sup> T 細胞から産生されるサイトカインであり、多彩な機能を有することがこれまでに報告されている。しかしながら、DC と NKT 細胞の相互反応における IL-21 の作用については不明である。そこで今回、DC による NKT 細胞からのサイトカイン産生誘導に対する IL-21 の作用について検討した。

### 【材料と方法】

以前 BALB/c マウス脾細胞から成長因子依存性の未成熟 DC (以下 iDC: immature DC) 細胞株である BC1 細胞を樹立した。本研究では未刺激の BC1 細胞を iDC, IL-21 で 72 または 96 時間刺激された BC1 細胞を IL-21/DC としてそれぞれ用いた。これらの細胞膜分子はフローサイトメトリーで解析した。さらに NKT 細胞を刺激する実験系においては、IL-21 刺激と同時に DC に対して  $\alpha$ -GalCer または溶媒によるパルスを行った。これらの DC によって *in vitro* または *in vivo* で NKT 細胞を刺激し、サイトカイン産生と細胞内サイトカインを定量した。一部の実験では、培養系に抗 CD86 単クローン抗体 (mAb) を加え、サイトカイン産生に対する効果を解析した。また、100 ng/マウスの IL-21 を腹腔内に投与 48 時間後に、2  $\mu$ g/マウスの  $\alpha$ -GalCer を腹腔内投与し、3, 6, 12, 24 時間後に採血し、血清中サイトカインを定量した。DC 刺激後の IL-12 産生の定量も行った。各サイトカインの定量は ELISA 法で行った。統計解析は Student's *t*-test を用い、有意差 5% 未満を統計学的有意とした。

### 【結果】

$\alpha$ -GalCer または溶媒をパルスした iDC または IL-21/DC と、NKT 細胞が含まれるナイロン非付着性脾細胞との共培養後の上清中 (*in vitro*) の IFN- $\gamma$  と IL-4 の濃度および、これら DC を直接脾臓に投与後の血清中 (*in vivo*) の IFN- $\gamma$  と IL-4 の

濃度を比較した。in vitro, in vivo いずれの実験系においても、 $\alpha$ -GalCer をパルスした DC によって有意な IFN- $\gamma$  と IL-4 の産生を認めたが、溶媒をパルスした DC では、IFN- $\gamma$  と IL-4 はほとんど検出されなかった。細胞内染色で NKT 細胞の IFN- $\gamma$  産生を確認したが、それ以外にも IFN- $\gamma$  産生細胞が観察された。従って、NKT 細胞の活性化によって他の脾細胞からの IFN- $\gamma$  産生も誘導されていると考えられた。注目すべき点として、 $\alpha$ -GalCer をパルスした IL-21/DC は同様に処理した iDC に比べ、有意に NKT 細胞からの IFN- $\gamma$  の産生増加を示した。しかし、IL-4 の産生に対しては iDC と IL-21/DC 間で差は認められなかった。

次に、DC が産生する IL-12 が、 $\alpha$ -GalCer パルス IL-21/DC によって刺激された NKT 細胞の IFN- $\gamma$  産生増強に関与しているか検討した。各 DC を抗 CD40 mAb で刺激後の IL-12 p40 産生量と、NKT 細胞と DC を in vitro で共培養する実験系における IL-12 p40 産生量を解析した。その結果、IL-21/DC の IL-12 産生量は iDC と比べ有意に減少しており、IL-21/DC による NKT 細胞の IFN- $\gamma$  産生増強に、IL-12 は関与していないと考えられた。

CD1d, CD40, CD86 分子の発現量は、IL-21/DC では iDC に比べ有意に増加していた。 $\alpha$ -GalCer パルス DC とナイロン非付着性脾細胞を共培養する実験系に、抗 CD86 mAb を加える実験系では、IL-21/DC 刺激による IFN- $\gamma$  産生は抗 CD86 mAb によって抑制されたが、iDC による産生では抑制効果は認めなかった。また、IL-4 産生に対しては、各 DC いずれの培養系においても、抗 CD86 mAb 添加の影響は見られなかった。

IL-21 を前投与したマウスに  $\alpha$ -GalCer を投与し、血清中のサイトカイン産生を経時的に分析した。血清 IFN- $\gamma$  濃度は、 $\alpha$ -GalCer 投与 3 時間後より上昇し、12 時間後にピークを示したが、IL-21 前投与マウスでは、3 および 6 時間後で非投与群より有意に増加していた。血清 IL-4 濃度は IL-21 前投与群と非投与群で差を認めなかった。

#### 【考察】

IL-21 および NKT 細胞は、抗腫瘍効果や I 型アレルギー反応を制御する作用を持つことが報告されているが、DC の NKT 細胞活性化能に対する IL-21 の作用はこれまでに報告されていない。本研究では、IL-21 で刺激した DC が未刺激の iDC と比較して、 $\alpha$ -GalCer 刺激後の NKT 細胞の IFN- $\gamma$  産生を特異的に増強させることを示した。また、その機序として、T 細胞受容体と CD28 などの共刺激分子から NKT 細胞に入るシグナルの増強が関与していると考えられた。

マウスに  $\alpha$ -GalCer を投与すると、NKT 細胞は速やかに多量の IFN- $\gamma$  を産生する。NKT 細胞から産生された IFN- $\gamma$  は次に NK 細胞の IFN- $\gamma$  産生を誘導するが、 $\alpha$ -GalCer 投与 8 時間後までの血中 IFN- $\gamma$  は、NKT 細胞のみから産生される。従って、IL-21 前投与マウスを用いた in vivo の実験結果から、NKT 細胞から産生される IFN- $\gamma$  が、IL-21 前投与と  $\alpha$ -GalCer 刺激によって先ず増加し、その後更なる IFN- $\gamma$  産生増強効果をもたらすと考えられた。

NKT 細胞から産生される IFN- $\gamma$  は、NK 細胞や CD8<sup>+</sup> T 細胞による腫瘍細胞排除の誘導や、I 型アレルギー反応を抑制する作用をもつ。また IL-21 は、NK 細胞や CD8<sup>+</sup> T 細胞を介する抗腫瘍効果や、B 細胞を介する I 型アレルギー反応を制御する作用を持つ。本研究の結果は、IL-21 による抗腫瘍効果のメカニズム解明に寄与すると同時に、I 型アレルギー制御に対する治療戦略を提供すると考えられた。

本研究では、IL-21 が DC に作用し、この DC で刺激された NKT 細胞による IFN-

$\gamma$  産生を選択的に増強させることを明らかにした. NKT 細胞はサイトカイン産生を介してアレルギー, 自己免疫疾患の制御に関与している. このため, DC-NKT 細胞相互反応によって産生される Th1/Th2 サイトカインバランス制御メカニズムの解明は, 新しい調節機構を用いた I 型アレルギー疾患を含む免疫疾患に対する治療法開発などの臨床応用の発展につながると考えられる.

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 田 諭

副 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

## インターロイキン-21処理樹状細胞によって刺激された NKT 細胞のインターフェロン- $\gamma$ 産生増強効果

NKT 細胞は、NK 細胞および T 細胞の機能を併せ持ち、自然免疫および獲得免疫の制御に深く関与している。NKT 細胞は、抗原提示細胞上の CD1d に結合した  $\alpha$ -ガラクトシルセラミド ( $\alpha$ -GalCer) などの脂質抗原により活性化され、T ヘルパー I 型 (Th1) である IFN- $\gamma$  および Th2 サイトカインである IL-4 などを迅速かつ多量に産生する。樹状細胞 (dendritic cells, DC) は強力な抗原提示細胞であり、T 細胞のみならず NKT 細胞も強く活性化し、種々のサイトカイン産生を誘導する。従って、DC 刺激による NKT 細胞からのサイトカイン産生制御は、今後 I 型アレルギー反応の制御を含めた種々の臨床応用に資すると考えられている。近年同定された IL-21 は、CD4<sup>+</sup> T 細胞から産生されるサイトカインであり、多彩な機能を有することがこれまでに報告されている。しかしながら、DC と NKT 細胞の相互反応における IL-21 の作用については不明である。

申請者は、DC の NKT 細胞に対する制御能に対し、IL-21 がどのように作用するか解析した。 $\alpha$ -GalCer または溶媒をパルスした immature DC (iDC) または IL-21/DC と、NKT 細胞が含まれるナイロン非付着性脾細胞との共培養後の上清中 (in vitro) の IFN- $\gamma$  と IL-4 の濃度および、これら DC を直接脾臓に投与後の血清中 (in vivo) の IFN- $\gamma$  と IL-4 の濃度を比較した。in vitro, in vivo いずれの実験系においても、 $\alpha$ -GalCer をパルスした DC によって有意な IFN- $\gamma$  と IL-4 の産生を認めたが、溶媒をパルスした DC では、IFN- $\gamma$  と IL-4 はほとんど検出されなかった。注目すべき点として、 $\alpha$ -GalCer をパルスした IL-21/DC は同様に処理した iDC に比べ、有意に NKT 細胞からの IFN- $\gamma$  の産生増加を示した。しかし、IL-4 の産生に対しては iDC と IL-21/DC 間で差は認められなかった。

IL-21 を前投与したマウスに  $\alpha$ -GalCer を投与し、血清中のサイトカイン産生を経時的に分析した。血清 IFN- $\gamma$  濃度は、 $\alpha$ -GalCer 投与 3 時間後より上昇し、12 時間後にピークを示したが、IL-21 前投与マウスでは、3 および 6 時間後で非投与群より有意に増加していた。血清 IL-4 濃度は IL-21 前投与群と非投与群で差を認めなかった。マウスに  $\alpha$ -GalCer を投与すると、NKT 細胞は速やかに多量の IFN- $\gamma$  を産生する。NKT 細胞から産生された IFN- $\gamma$  は次に NK 細胞の IFN- $\gamma$  産生を誘導するが、 $\alpha$ -GalCer 投与 8 時間後までの血中 IFN- $\gamma$  は、NKT 細胞のみから産生される。従って、IL-21 前投与マウスを用いた *in vivo* の実験結果から、NKT 細胞から産生される IFN- $\gamma$  が、IL-21 前投与と  $\alpha$ -GalCer 刺激によって先ず増加し、その後更なる IFN- $\gamma$  産生増強効果をもたらすと考えられた。これらの実験結果より、IL-21 で刺激された DC は NKT 細胞の IFN- $\gamma$  産生を選択的に増強することが判明した。IL-21/DC は CD1d, CD40, CD86 分子の発現量が iDC に比べ有意に増加していた。 $\alpha$ -GalCer パルス DC とナイロン非付着性脾細胞を共培養する実験系に、抗 CD86 mAb を加える実験系では、IL-21/DC 刺激による IFN- $\gamma$  産生は抗 CD86 mAb によって抑制されたが、iDC による産生では抑制効果は認めなかった。また、IL-4 産生に対しては、各 DC いずれの培養系においても、抗 CD86 mAb 添加の影響は見られなかった。このため、IL-21/DC による NKT 細胞の IFN- $\gamma$  産生増強は、DC 上の CD1d や CD86 に対応する、NKT 細胞上の T 細胞受容体や CD28 などの共刺激分子からのシグナル増強が関与していると考えられた。

口答発表後、副査の上出教授から、DC 亜集団間での IL-21 の作用の差異について、IL-21 産生誘導の機序について、DC の CD40 発現量増加に対する評価について、副査の小野江教授から、IL-21 受容体の細胞内シグナル伝達について、IL-21 の Th1 誘導の要因について、主査の福田教授から、IFN- $\gamma$  産生細胞の評価について、本研究の臨床応用への展望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。

この論文は、IL-21 の DC に対する新たな作用を明らかにし、DC と NKT 細胞の細胞間作用の解明や NKT を用いた新しい治療への応用が期待される。

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。