

学位論文題名

多発性硬化症患者における
末梢血 CD28⁻CD4⁺ T細胞に関する研究

学位論文内容の要旨

I. 背景

多発性硬化症 (MS: multiple sclerosis) は中枢神経の炎症性脱髄性疾患であり、臨床的に中枢神経症状の増悪と寛解を繰り返すことを特徴としている。MS の病態は完全には解明されていないが、中枢神経のミエリン抗原に反応性 T の細胞が重要な役割を果たしていると考えられている。このミエリン抗原反応性 T 細胞は、健全な状態では免疫調節性細胞の働きを含む末梢性トレランス誘導機構により抑制されており、免疫調節性細胞の機能不全や自然免疫系の活性化など、何らかの機転でこの機構が破綻した際に MS が発症または増悪すると想定される。

CD28 は T 細胞上の共刺激分子であり、CD28 を介する刺激は T 細胞抗原受容体からの刺激を受けた T 細胞の、その後の活性化を決定する重要な要素である。しかしながら、興味深いことに慢性関節リウマチ、Wegener 肉芽腫症などの自己免疫性疾患の患者末梢血中に、CD28 を発現しない CD4⁺T 細胞が増加していることが報告されている。これらの患者の CD28⁻CD4⁺T 細胞は CD28 の発現を欠くにもかかわらず、刺激により大量のインターフェロン (IFN: interferon) - γ を産生し、疾患の増悪に関与していると考えられている。MS においても、一部の患者で CD28⁻CD4⁺T 細胞が増加していることや、患者のミエリン抗原反応性 T 細胞が CD28 からの共刺激なしに増殖できることが報告されており、CD28⁻CD4⁺T 細胞が MS の病態に関与している事が考えられる。

II. 目的

MS 患者末梢血単核細胞を用いて CD28⁻CD4⁺T 細胞の頻度、表現型、機能を解析し、この疾患における CD28⁻CD4⁺T 細胞の病態への関与を明らかにすることを目的とした。

III. 方法

28 人の MS 患者 (無治療患者 17 人, IFN β -1b 投与患者 11 人), および 17 人の健常者の末梢血から単核細胞を分離し、フローサイトメーターを用いて CD28⁻CD4⁺T 細胞

の頻度、表現型、細胞内サイトカイン産生を解析した。

IV. 結果

全 CD4⁺T 細胞中における CD28⁺CD4⁺T 細胞の頻度は健常者では 0.19~27.17% (5.20±6.88)であったが、MS 患者においては無治療患者で 1.47~39.02% (13.00±11.06%), IFNβ-1b 投与患者で 0.23~30.52% (7.58±9.22%)であり、健常者と比べて無治療患者で有意に高値を示した。phorbol-myristate-acetate (PMA), ionomycin (IM)刺激に対する IFN-γ産生は、患者、健常者とも CD28⁺CD4⁺T 細胞で CD28⁺CD4⁺T 細胞分画と比べて有意に高値であり、さらに、MS 患者では健常者と比べて高値を示した。IL-4 の産生は MS 患者と健常者間で明確な差は見られなかった。

次に CD28⁺CD4⁺T 細胞における CD28 の代替となりうる共刺激分子を検索したが、ICOS, OX-40, 4-1BB などの既知の分子の発現は見られず、CD27 の発現は CD28⁺細胞分画と比べてむしろ低値であった。加えて、慢性関節リウマチ患者において CD28⁺CD4⁺T 細胞の共刺激分子として働くことが報告されている、NKG2D や killer immunoglobulin-like receptor の発現も見られなかった。

最後に CD28⁺CD4⁺T 細胞の分化段階に関して検討したところ、MS 患者 CD28⁺CD4⁺T 細胞中に CD45RA^{hi}CCR7⁺の表現型を示す細胞亜分画が増加していることが判明した。この CD45RA^{hi}CCR7⁺CD28⁺CD4⁺T 細胞においては、PMA, IM 刺激に対して IFN-γ産生細胞は認められたが、IL-4 産生細胞率はきわめて低値であり、IFN-γ/IL-4 比の著明な高値を示した。

V. 考察

本研究ではまず、健常者と比べて MS 患者末梢血中で CD28⁺CD4⁺T 細胞が増加していることが示された。この CD28⁺CD4⁺T 細胞分画では、健常者と比べて MS 患者において IFN-γ産生細胞率が高いものの、IL-4 産生細胞率は健常者と同等であり、CD28⁺CD4⁺T 細胞の IFN-γ/IL-4 比が高値になることが、MS の病態と関連していると考えられた。

続いて、MS 患者 CD28⁺CD4⁺T 細胞中に、CD45RA^{hi}CCR7⁺の表現型を示し、IFN-γ/IL-4 比の著明な高値を示す特異な細胞亜分画が含まれていることが示された。この表現型を示す細胞分画は CD28⁺細胞分画にはみられず、MS 患者 CD28⁺CD4⁺T 細胞は特異な環境において生成されたエフェクター細胞であると考えられた。

V. 結語

本研究では MS 患者末梢血中に CD28⁺CD4⁺T 細胞が増加しており、この細胞集団は MS 患者において高い IFN-γ産生率を示すことを明らかにした。本細胞の機能を制御することが可能となれば、MS を初めとする自己免疫性疾患の新たな治療法が確立されることが考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 笠 原 正 典

副 査 教 授 小 野 江 和 則

副 査 教 授 佐 々 木 秀 直

学 位 論 文 題 名

多発性硬化症患者における

末梢血 CD28⁻CD4⁺ T細胞に関する研究

多発性硬化症(multiple sclerosis: MS)は中枢神経の炎症性脱髄性疾患である。MSの再発予防薬としては interferon (IFN) β -1b の有効性がいくつかの臨床試験で確認されているが、その効果は満足できるものではないのが現状である。CD28 は T 細胞上の重要な共刺激分子であるが、慢性関節リウマチなどの自己免疫性疾患患者の末梢血中に、CD28 を発現しない CD4⁺T 細胞 (CD28⁻CD4⁺T 細胞)が増加していることが報告されている。これらの患者の CD28⁻CD4⁺T 細胞は刺激により大量の IFN- γ を産生し、疾患の増悪に関与していると考えられている。MS においても、一部の患者で CD28⁻CD4⁺T 細胞が増加していることが報告されているが、その病態への関わりは十分には解明されていない。

これらの背景をふまえ、CD28⁻CD4⁺T 細胞の MS 病態への関与を明らかにするため、MS 患者の末梢血単核細胞を用い、フローサイトメーターを用いて CD28⁻CD4⁺T 細胞の頻度、表現型、細胞内サイトカイン産生を解析した。

全 CD4⁺T 細胞中における CD28⁻CD4⁺T 細胞の頻度は健常者では 0.19–27.17% (5.20 \pm 6.88)であったが、MS 患者においては無治療患者で 1.47–39.02% (13.00 \pm 11.06%)、IFN β -1b 投与患者で 0.23–30.52% (7.58 \pm 9.22%)であり、健常者と比べて無治療患者で有意に高値を示した。phorbol-myristate-acetate (PMA)、ionomycin (IM) 刺激に対する IFN- γ 産生は、患者、健常者とも CD28⁻CD4⁺T 細胞で CD28⁺CD4⁺T 細胞分画と比べて有意に高値であり、さらに、MS 患者では健常者と比べて高値を示した。IL-4 の産生は MS 患者と健常者間で明確な差は見られなかった。

次に CD28⁻CD4⁺T 細胞における CD28 の代替となりうる共刺激分子を検索したが、ICOS, OX-40, 4-1BB などの既知の分子の発現は見られず、CD27 の発現は CD28⁺細胞分画と比べてむしろ低値であった。加えて、慢性関節リウマチ患者において CD28⁻CD4⁺T 細胞の共刺

激分子として働くことが報告されている, NKG2D や killer immunoglobulin-like receptor の発現も見られなかった.

最後に CD28⁻CD4⁺T 細胞の分化段階に関して検討したところ, MS 患者 CD28⁻CD4⁺T 細胞中に CD45RA^{hi}CCR7⁻の表現型を示す細胞亜分画が増加していることが判明した. この CD45RA^{hi}CD28⁻CD4⁺T 細胞においては, PMA, IM 刺激に対して IFN- γ 産生を認めたが, IL-4 産生細胞率はきわめて低値であり, IFN- γ /IL-4 比の著明な高値を示した.

本研究では MS 患者末梢血中に CD28⁻CD4⁺T 細胞が増加しており, この細胞集団は MS 患者において高い IFN- γ 産生率を示すことを明らかにした. 本細胞の機能を制御することが可能となれば, MS を初めとする自己免疫性疾患の新たな治療法が確立されると考えられた.

公開発表にあたってはまず, 副査の佐々木教授から「CD28⁻CD4⁺T 細胞と MS 臨床像との関係」, 「MS 治療薬の CD28⁻CD4⁺T 細胞への影響」, 「CD28⁻CD4⁺T 細胞の慢性関節リウマチや MS の病態における役割」に関する質問があった. 続いて, 副査の小野江教授から, 「CD28⁻CD4⁺T 細胞が CD28 を欠くにもかかわらずサイトカイン産生を行うことを, PMA/IM 以外の刺激で確認したか」, 「CCR7 が陰性である事から考えられる CD45RA^{hi}CCR7⁻亜分画の機能について」の質問があった. また, 主査の笠原教授から「CD45RA^{hi}CCR7⁻亜分画の増加と MS 臨床像との関連」, 「CD45RA^{hi}CCR7⁻亜分画が増加する要因」に関する質問があった. いずれの質問に対しても, 申請者は実験結果や文献を引用して説明し, おおむね適切に解答した.

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.