

学位論文題名

SL/Kh マウス胸腺における V α 14 invariant NKT 細胞の
分化成熟障害についての研究

学位論文内容の要旨

I. 背景

SL/Kh マウスは白血病自然発症マウスで、内在性のマウス白血病ウイルス (murine leukemia virus, MuLV) によって、きわめて高率に、また短い潜伏期間で preB 細胞リンパ腫をきたす。SL/Kh マウスが preB リンパ腫を発症するのは、内在性の MuLV プロウイルスが c-Myc, Stat5b, N-Myc などの多数の活性化遺伝子のインテグレーションサイトに挿入されるためと考えられている。しかし、さまざまな環境因子や他の遺伝的背景なども、これらの造血器腫瘍発生に寄与していると考えられており、正確な発症メカニズムは明らかにはなっていない。

invariant NKT (以下 iNKT) 細胞は、CD1d 拘束性に糖脂質を認識して、感染、腫瘍、アレルギー、自己抗原に対する免疫反応を調節する重要な役割を果す。iNKT の分化成熟の仕組みは、通常の T 細胞とは大きく異なっており胸腺内 CD4⁺CD8⁺ 両陽性 (以下 DP) 細胞上の CD1d 分子によって正の選択を受ける。その後、iNKT 細胞は、胸腺内において CD44^{low} NK1.1⁻ (Stage 1) → CD44^{high} NK1.1⁻ (Stage 2) → CD44^{high} NK1.1⁺ (Stage 3) と成熟分化する。iNKT 細胞の機能について、腫瘍の進展・転移に促進的、あるいは逆に抑制的に作用するという相反する報告がなされている。造血器腫瘍については、iNKT 細胞がこれらの腫瘍細胞を抑制するという報告が主であり、SL/Kh マウスのリンパ腫の進展に対して iNKT 細胞分化成熟障害が何らかの関与があるのではないかと考えた。

II. 目的

SL/Kh マウスにおける胸腺 iNKT 細胞の分化成熟異常の検討と、その機序に関わっている因子の検討を目的とした。

III. 方法

SL/Kh マウスの胸腺、脾臓、肝臓の iNKT のポピュレーションサイズを FACS で解析した。さらにどの分化の段階で iNKT 細胞の成熟が障害されているのかを検討するために、invariant V α 鎖の PCR による増幅と、胸腺内 iNKT 細胞の NK マーカーと CD44 の発現を FACS で検討した。

NK 受容体の解析のために、各系統のマウスの抗 NK 1.1 抗体で検出される分子を PCR 法により詳細に検討した。また、脾臓細胞における iNKT 細胞の NK マーカーの検討、脾臓細胞における NK 細胞数の検討を FACS で行い、iNKT 細胞の機能に関しては、 α Galactosylceramide (以下 α GC) 腹腔内投与後の *ex vivo* における IL-4、IFN- γ の産生能を ELISA 法で検討した。

最後に、iNKT 細胞の成熟障害と機能低下の要因を探るために胸腺 DP 細胞の数、CD1d の発現を FACS で解析した。さらに、NK 細胞、iNKT 細胞の分化増殖に関わっていると報告のある遺伝子群を、全胸腺細胞の RNA を抽出して RT-PCR 法、および Real time PCR 法にて検討した。

IV. 結果と考察

SL/Kh マウス胸腺において、AKR マウス、B6 マウスと比べ、iNKT 細胞の比率の低下傾向を認め、また、実数においては、AKR、B6 マウスいずれに比しても有意に減少していた。一方、脾臓と肝臓においては iNKT 細胞の比率および実数に、SL/Kh、AKR、B6 間で有意差は認められなかった。SL/Kh マウスの Vα14Jα18 の mRNA 量は B6 マウスと同等であった。すなわち、SL/Kh マウスでは TCR の再構成に障害はなく、それ以降の iNKT 細胞の成熟分化に障害が生じていることが考えられた。B6 マウスの iNKT 細胞は大多数が Stage 3 にまで分化しているのと比べて、SL/Kh マウスの iNKT 細胞の大部分は Stage 2 で分化が停止していた。同様に CD44^{high}CD122⁺ 細胞の割合は、AKR、B6 マウスいずれに比しても減少していた。また、CD44^{high}Ly49A⁺細胞の割合では、AKR マウスと比べると有意に低下していたが、B6 マウスとは差が認められなかった。以上の結果より、SL/Kh マウスの胸腺における iNKT 細胞分化成熟障害は、Stage 2 から Stage 3 への移行期に存在することが確認された。

PCR 法にて、SL/Kh マウスでは NKR-P1C はほとんど発現せず、抑制シグナルを伝達する NKR-P1B が主体であることが判明した。FACS による解析では、SL/Kh マウス脾臓 NK1.1⁺iNKT 細胞割合は著明に減少していた。また、NK 細胞の割合に関しても、B6 マウス脾臓と比し有意に低下していた。

続いて末梢の iNKT 細胞の機能を検討した。αGC 刺激後の IL-4 と IFN-γ 産生能を検討したところ、いずれのサイトカインも、SL/Kh マウスで有意に低下していた。SL/Kh マウスでは iNKT 細胞の分化停止のため、末梢 iNKT 細胞の機能が低下していることを示すと考えられた。

続いて、SL/Kh マウスの DP 細胞分画の割合が有意に低下していることが判明した。また、DP 胸腺細胞上の CD1d 分子の平均蛍光強度が、B6 マウスに比べて SL/Kh で低いことが判明した。しかし、AKR マウスの CD1d は、SL/Kh の CD1d に比べさらに発現量が低いことが判明した。

分化成熟障害に影響を与えることが予想される遺伝子 IL-15 は、B6 マウスとの比較では mRNA レベルの差異は認められなかった。次に、IL-15R の下流のシグナルに関与し、NK 細胞機能に影響のある Stat5b の発現を検討したが、SL/Kh マウスで量的な低下等は認められなかった。従って、SL/Kh マウスの iNKT 細胞分化成熟障害は、IL-15/IL-15R、およびその下流分子の量的低下によるわけではないと考えられた。さらに、分化障害が報告されている T-bet および Hexb 遺伝子を検討したが、AKR、B6 マウスと比べて SL/Kh マウスに量的異常がないことが示された。

V. 結語

本研究により、SL/Kh マウスでは iNKT 細胞の分化成熟障害を来たしており、Stage2 から Stage3 への分化プロセスに障害があることを示した。分化異常のメカニズムとして、分化成熟に必須である IL-15 とその下流の Stat5b、Stage 2 → 3 の段階に障害に関与する T-bet や Hexb の量的異常は SL/Kh マウスでは認められなかった。ただし、DP 胸腺細胞の減少、および CD1d 発現の低下が同時に存在すること、NK1.1 の主体が NKR-P1B であることなどが、SL/Kh マウスにおける iNKT

細胞の分化障害に関与する可能性が推察された。SL/Kh マウスの iNKT 細胞の分化成熟の異常メカニズムの解明をすることによって、造血器腫瘍のみならず、悪性腫瘍に対する抗腫瘍効果や免疫制御機構の解明につながり、今後の iNKT 細胞の治療への応用の一助となると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 小 野 江 和 則
副 査 教 授 笠 原 正 典

学 位 論 文 題 名

SL/Kh マウス胸腺における V α 14 invariant NKT 細胞の 分化成熟障害についての研究

SL/Kh マウスは白血病自然発症マウスで、内在性のマウス白血病ウイルス (murine leukemia virus, MuLV) によって、きわめて高率に、また短い潜伏期間で preB 細胞リンパ腫をきたす。さまざまな環境因子や他の遺伝的背景なども、これらの造血器腫瘍発生に寄与していると考えられており、正確な発症メカニズムは明らかにはなっていない。一方, invariant NKT (以下 iNKT) 細胞は、CD1d 拘束性に糖脂質を認識して、感染、腫瘍、アレルギー、自己抗原に対する免疫反応を調節する重要な役割を果たす。iNKT の分化成熟の仕組みは胸腺内 CD4⁺ CD8⁺ 両陽性 (以下 DP) 細胞上の CD1d 分子によって正の選択を受ける。その後, iNKT 細胞は、胸腺内において CD44^{low} NK1.1⁻ (Stage 1) → CD44^{high} NK1.1⁻ (Stage 2) → CD44^{high} NK1.1⁺ (Stage 3) と成熟分化する。

SL/Kh マウスの胸腺、脾臓、肝臓の iNKT のポピュレーションサイズを FACS で解析したところ, SL/Kh マウス胸腺では、実数においては、AKR, B6 マウスいずれに比しても有意に減少していた。さらにどの分化の段階で iNKT 細胞の成熟が障害されているのかを検討するために, invariant V α 鎖の PCR による増幅を行ったところ, SL/Kh マウスの V α 14J α 18 の mRNA 量は B6 マウスと同等であり, SL/Kh マウスでは TCR の再構成に障害はなく, それ以降の iNKT 細胞の成熟分化に障害が生じていることが考えられた。胸腺内 iNKT 細胞の NK マーカーと CD44 の発現を FACS で検討した。B6 マウスの iNKT 細胞は大多数が Stage 3 にまで分化しているのと比べて, SL/Kh マウスの iNKT 細胞の大部分は Stage 2 で分化が停止していた。

末梢における iNKT 細胞の解析では, SL/Kh マウス脾臓 NK1.1⁺ iNKT 細胞割合は著明に減少していた。また, NK 細胞の割合に関しても, B6 マウス脾臓と比し有意に低下していた。次に末梢 iNKT 細胞の機能を検討したところ, α Galactosylceramide (以下 α GC) 腹腔内

投与後の *ex vivo* における IL-4, IFN- γ の産生能を ELISA 法で検討したところ、いずれのサイトカインも、SL/Kh マウスで有意に低下していた。

NK 受容体の解析のために PCR 法により詳細に検討した。SL/Kh マウスでは NKR-P1C はほとんど発現せず、抑制シグナルを伝達する NKR-P1B が主体であることが判明した。さらに、NK 細胞、iNKT 細胞の分化増殖に関わっていると報告のある遺伝子群を、全胸腺細胞の RNA を抽出して RT-PCR 法、および Real time PCR 法にて検討した。分化成熟障害に影響を与えることが予想される遺伝子 IL-15 は、B6 マウスとの比較では mRNA レベルの差異は認められなかった。他にも分化障害が報告されている T-bet および Hexb 遺伝子などのさまざまな遺伝子群を検討したが、AKR, B6 マウスと比べて SL/Kh マウスに量的異常のあるものはないことが示された。

最後に、iNKT 細胞の成熟障害と機能低下の要因を探るために胸腺 DP 細胞の数、CD1d の発現を FACS で解析した。SL/Kh マウスの DP 細胞分画の割合が有意に低下していることが判明し、また、DP 胸腺細胞上の CD1d 分子の平均蛍光強度が、B6 マウスに比べて SL/Kh で低いことが判明した。しかし、AKR マウスの CD1d は、SL/Kh の CD1d に比べさらに発現量が低いことが判明した。

本研究により、SL/Kh マウスでは iNKT 細胞の分化成熟障害を来たしており、Stage2 から Stage3 への分化プロセスに障害があることを示した。分化異常のメカニズムとして、DP 胸腺細胞の減少および CD1d 発現の低下が同時に存在すること、NK1.1 の主体が NKR-P1B であることなどが、SL/Kh マウスにおける iNKT 細胞の分化障害に関与する可能性が推察された。SL/Kh マウスの iNKT 細胞の分化成熟の異常メカニズムの解明をすることによって、造血器腫瘍のみならず、悪性腫瘍に対する抗腫瘍効果や免疫制御機構の解明につながり、今後の iNKT 細胞の治療への応用につながる可能性があり、今後の発展が期待される。

公開発表にあたっては、副査の笠原教授から、「iNKT 分化障害と DP 胸腺細胞の減少および CD1d 発現低下の関連性」のコメントの後、「iNKT 分化障害とリンパ腫発症の因果関係について」、「iNKT 細胞のリガンドに関する最近の知見について」、ついで副査の小野江教授から「NK1.1 の subtype と iNKT 細胞の機能について」、「iNKT 細胞上の NK 受容体の発現の違いについて」、「SL/Kh マウスの脾臓の iNKT 細胞で NK1.1 が発現していない理由について」、主査の小池教授からは、「AKR マウスで CD1d 発現の低下があるが、iNKT 細胞の分化が正常である理由について」、「SL/Ni マウスの血管炎に iNKT 細胞が関与している可能性について」、「iNKT 細胞異常とヒトの疾患との関係について」、それぞれ質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は実験結果や文献およびスライドの図を引用して説明し、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。