

博士(医学) 桂田武彦

学位論文題名

潰瘍性大腸炎における末梢血および
大腸粘膜固有層 NKG2A+ T細胞の減少

－潰瘍性大腸炎における NKG2A+ T細胞－

学位論文内容の要旨

【背景と目的】抑制性 NK レセプター（以下 iNKR_s）は主に NK 細胞に発現しているレセプターであるが、一部の T 細胞分画にも発現しており、細胞傷害性やサイトカイン放出を含む T 細胞の抗原に対する機能を調節している。iNKR_s のひとつである NKG2A を発現した T 細胞は、ウイルス感染や一部の腫瘍、移植片対宿主病などで免疫調節に役割を果たしていることが報告されている。この研究では、炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease, 以下 IBD)発症に対する NKG2A+ T 細胞の役割を明らかにするために、臨床的、病理組織学的に潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis, 以下 UC) と類似している DSS (dextran sulfate sodium) 腸炎マウスモデルとヒトの IBD において、T 細胞上の NKG2A の発現について調べた。

【材料と方法】マウスでの検討では、Balb/C マウスに DSS 水溶液を 7 日間自由飲水させ DSS 腸炎モデルを作製し、末梢血単核球 (PBMCs) および大腸の粘膜固有層内単核球 (LPMCs) を採取し経時的にフローサイトメトリーで NKG2A+ T 細胞について検討した。ヒトでの検討では、20 例の UC 患者、16 例のクロhn病 (Crohn's disease, 以下 CD) 患者および 23 例の健常コントロール (healthy control, 以下 HC) より末梢血を採取しフローサイトメトリーで NKG2A+ T 細胞について検討した。また、UC (n=3)、CD (n=3)、コントロール (n=4) の大腸切除検体を免疫染色し、大腸粘膜固有層の NKG2A+ T 細胞について標本を鏡検し強拡 10 視野あたりの数をカウントし比較検討した。

【結果】

マウスの実験では、DSS 飲水マウスは DSS 飲水 3 日目以降から下痢、血便、体重減少を来たし、day 10 から 14 にかけて症状は回復し、day 21 には体重は元通りに増加した。コントロール群のマウスでは、末梢血 T 細胞中の NKG2A+細胞の割合は 0 日目で $3.51\% \pm 0.71\%$ の割合で観察され、経時的な変化は見られなかった。対照的に DSS 腸炎マウスでは末梢血 T 細胞中の NKG2A+細胞の割合はコントロールと比較し有意に減少し (day 7, DSS: $1.77\% \pm 0.60\%$ 、コントロール: $3.45 \pm 0.74\%$ 、 $p=0.00002$)、DSS 飲水終了後元通りに回復した。一方で、大腸粘膜固有層の NKG2A+ T 細胞は day 7 に有意に増加し、day 21 には DSS 飲水前に近いレベルに戻っていた (day 0: $4.88\% \pm 1.42\%$ 、day 7: $7.84\% \pm 2.12\%$ 、day 21: $5.76\% \pm 1.13\%$)。

ヒト末梢血での検討では、NKG2A+ T 細胞の割合は UC で HC、CD に比べて有意に低かった (HC: 9.1 ± 6.2 、UC: 4.8 ± 2.2 、CD: 9.3 ± 7.8 、それぞれ $p=0.0048$ 、 $p=0.019$)。UC 患者における NKG2A+ T 細胞の割合は疾患活動性の有無で差は見られなかった。NKG2A の発現が減少している T 細胞分画について詳細な検討を行ったところ、NKG2A+細胞の減少は

CD3+CD8+細胞, CD3+CD56+細胞, CD3+TCR γ δ +細胞の分画で観察された。CD4+T細胞はNKG2Aを発現していなかった。一方, NK細胞上のNKG2Aの発現についてはUC, CD, HCで差はなかった。免疫染色による大腸粘膜固有層のNKG2A+T細胞の検討では, UC患者の大腸粘膜固有層のNKG2A+T細胞の割合はHC, CDと比較して減少していた(UC: 3.18% \pm 1.02%, HC: 7.14% \pm 1.07%, CD: 9.94% \pm 4.73%, p=0.004, p=0.073)。UC患者では, 末梢血のみならず, 大腸粘膜でもNKG2A+T細胞が減少していることがわかった。

【考察】IBDは腸管に限局した慢性再発性の炎症性疾患である。IBDは腸管の免疫担当細胞の機能が不適切であったり, バランスに異常があつたりといった, 免疫応答における異常の結果から起きている可能性が示されているが, 原因は不明である。

この研究で我々はUC患者の末梢血および大腸粘膜固有層のNKG2A+T細胞の割合がHC, CDと比較して有意に減少していることを示した。HC, IBD患者どちらの大腸粘膜固有層にもNKG2A+T細胞が検出されており, 局所の免疫状態を保つためにこの細胞が何らかの関わりを持っていると考えられる。DSS腸炎マウスでは大腸粘膜固有層のNKG2A+T細胞は腸炎発症とともに有意に増加した。これらの結果により, NKG2A+T細胞は末梢血から傷害を受けた組織に移動し, 過大な傷害を避けるために腸管の免疫調節に役割を果たしている可能性が示唆された。UC患者ではNKG2A+T細胞がPBMCs, LPMCsともに減少しているため, 免疫調節が不十分となり腸炎が起きている可能性が考えられる。UCにおいて数多く報告してきた免疫系に関する異常は, ほとんどが活動期にのみ認められ緩解期には正常化しており, 炎症による二次的な変化をみている可能性を否定できなかった。今回の研究では, NKG2A+T細胞がUC患者で有意に少なく, かつその減少が疾患活動性の有無で影響を受けないことを示した。またUC患者特有の変化であることからも, UC患者でのこの細胞の減少はUCにとって病因に近い本質的な異常である可能性がある。UC患者のNKG2Aの発現の低下がT細胞分画だけでみられNK細胞分画ではみられなかつことはUC患者のT細胞上のNKG2Aの発現そのものに異常があり, T細胞固有のNKG2Aの転写調節機構に異常がある可能性も考えられる。

また, 末梢血中のNKG2A+T細胞の割合を評価することが, UCの診断マーカーとして臨床的に役立つ可能性が示唆される。UCとCDの鑑別不能な症例に対してNKG2A+T細胞の測定が鑑別に有用である可能性が示唆される。

本研究ではNKG2A+T細胞が腸管において制御機能を果たしている可能性が示唆された。もしNKG2A+T細胞の制御機能が証明され, この細胞を量的・質的にコントロールすることが可能となれば, 将来的にはUCに対する新しい療法の開発につながる可能性があると思われる。

【結論】今回の検討により, ①DSS飲水マウスで末梢血T細胞中のNKG2A+細胞の割合が減少し, 大腸粘膜固有層T細胞中のNKG2A+細胞の割合が増加していること, ②潰瘍性大腸炎患者において末梢血T細胞, 大腸粘膜固有層T細胞中のNKG2A+細胞の割合が減少していることが示され, NKG2A+T細胞の減少がUCの病因のひとつである可能性が示唆された。本細胞の抑制機能については更なる検討を加える必要があるが, UC, CDを鑑別する新しい診断マーカーとして, UCに対する新しい治療法として, 臨床応用の発展に期待したい。

学位論文審査の要旨

主査教授 浅香正博

副査教授 笠原正典

副査教授 今村雅寛

学位論文題名

潰瘍性大腸炎における末梢血および 大腸粘膜固有層 NKG2A + T 細胞の減少

－潰瘍性大腸炎における NKG2A + T 細胞－

本研究では炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease, 以下 IBD)発症に対する抑制性 NK レセプターである NKG2A を発現した T 細胞の役割を明らかにするため, DSS(dextran sulfate sodium) 腸炎マウスモデルとヒトの IBD において, T 細胞上の NKG2A の発現について検討を行った. DSS 腸炎マウスで末梢血 T 細胞中の NKG2A+細胞の割合が減少し, 大腸粘膜固有層 T 細胞中の NKG2A+細胞の割合が増加していた. ヒトでの検討では, 潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis, 以下 UC) 患者において末梢血 T 細胞, 大腸粘膜固有層 T 細胞中の NKG2A+細胞の割合がともにクローン病 (Crohn's disease, 以下 CD) 患者および健常人と比較して有意に減少していた. これらの結果より, NKG2A+T 細胞は末梢血から傷害を受けた組織に移動し, 炎症を抑制するために働いている可能性が示唆され, UC 患者では本細胞が末梢血, 大腸粘膜とともに減少しているため, 免疫調節が不十分となり腸炎が起きている可能性が考えられた.

口頭発表に際し, 副査笠原教授から T 細胞上の NKG2A の発現の意義について質問があった. それに対して NKG2A は T 細胞に数%の発現があり, ウィルス感染や一部の腫瘍などで NKG2A+T 細胞は標的細胞の HLA-E を認識し, tyrosin based inhibition motifs (ITIMs) を介して抑制シグナルを伝えることにより, T 細胞の直接の細胞傷害を抑制するとともに, サイトカイン産生などを介し他の炎症細胞も間接的に抑制している可能性があると説明した. また, NKG2A が NK 細胞では異常がなく, T 細胞のみで発現に異常がある点についての質問があり, NKG2A と heterodimer を形成している CD94 のプロモーター領域が 2 つ存在し, T 細胞と NK 細胞で使用領域が異なることから, NKG2A でも同様のことが起きている可能性があり, 今後の研究課題であると回答した.

次いで副査今村教授から NKG2A と拮抗的に働いている NKG2D についての検討は行ったかどうか質問があり, NKG2D については UC では明らかな差はみられなかったこと, 今回検討はしていないが, 最近 CD では NKG2D+T 細胞の増加が疾患と関わっている報告があると回答した. また, NKG2A のリガンドの検討は行ったかという質問があり, HLA-E の免疫染色を行ったが明らかな差はなかったと回答した. さらに同じ IBD とされる UC と CD との違いはどこかという質問には, CD は前述の NKG2D+T 細胞の増加が

みられる点から、刺激型の細胞増加による細胞傷害性の増強による疾患である可能性が考えられ、UCは、抑制性の細胞であるNKG2A+T細胞が減少していることによる炎症へのブレーキが弱いために腸炎が起きる疾患である可能性が考えられると回答した。UCの緩解期の大腸粘膜固有層での検討を行ったかとの質問には、今回は増悪したための手術による検体のみであり、緩解期の手術検体は検体が少なく、今後の検討課題であると回答した。

主査浅香教授から、DSS腸炎モデルはUCのモデルなのか、CDのモデルなのか、あるいは両方なのか質問があり、現在いずれの疾患のモデル動物もないが、DSS腸炎モデルは臨床的、病理組織学的にUCに類似しており、導入が容易で管理しやすいことから汎用されているモデルであることを回答した。また、UCにおけるNKG2A+T細胞の減少は発症前からなのか発症後からなのかという質問には、今後NKG2A+T細胞が減少している健常人がUCを発症する症例があれば興味深い点、過敏性腸症候群では本細胞が減少している症例を認めた経験を説明した。さらに、ノックアウトマウス、トランスジェニックマウスを作製する予定はないかという質問には、今後作製したいと回答した。

本研究はNKG2A+T細胞の減少がUCの病因のひとつである可能性を示し、原因不明であるUCの病因解明への一步として高く評価され、今後、UC、CDを鑑別する新しい診断マークとしての可能性、新しい治療法としての可能性があると期待された。

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充分な資格を有するものと判定した。