

学位論文題名

H2-D^d-mediated regulation of IL-4 production during natural killer T cell and dendritic cell interaction

(NKT細胞と樹状細胞との会合における H2-D^d を介した IL-4 産生調節)

学位論文内容の要旨

Introduction

Natural killer T (NKT) cells are capable of subserving apparently opposite functions, the interferon (IFN)- γ mediated enhancement of host defense and interleukin (IL)-4 mediated immune regulation. Dendritic cells (DCs) are the potent professional antigen-presenting cells that are primarily responsible for initiation and regulation of immune responses against various antigens. DCs polarize naive CD4⁺ T cells to T helper 1 (Th1) or Th2 cells and generate an appropriate acquired immunity. Extracellular stimuli including pathogen associated molecular patterns (PAMPs) such as Toll like receptor (TLR) ligands modulate DC ability to induce Th1 or Th2 differentiation. Although DCs potently activate NKT cells to produce copious amounts of various cytokines, DC regulation of the IL-4 versus IFN- γ balance via NKT cell activation is not well characterized. In the present study, the effect of DC treatment with CpG oligodeoxynucleotide (ODN), a TLR9 ligand, on induction of the NKT cell cytokine production was examined.

Materials and methods

CpG-ODN-conditioned and α -galactosylceramide (α -GalCer)-loaded myeloid DCs (CpG-DCs) from BALB/c or C57BL/6 (B6) mice were co-cultured with nylon non-adherent splenocytes or whole thymocytes. Thereafter, amounts of cytokines (IL-4 and IFN- γ) in the culture supernatant were quantitated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In some experiments, α -GalCer-loaded CpG-DCs were incubated with anti-CD80 mAb, anti-CD86 mAb, anti-IL-12 monoclonal antibody (mAb), anti-H2-D^d mAb, or certain combinations of these mAbs. Then, the DCs were co-cultured with nylon non-adherent splenocytes in the presence of the mAb and the supernatants were collected and amounts of IL-4 and IFN- γ were measured. The intracellular IL-4 production was also analyzed on CD1d-dimer⁺ TCR β ⁺ NKT cells by

flow cytometry. Expression of surface molecules on CpG-DCs was analyzed by flow cytometry.

Results

CpG-DCs showed enhanced ability to induce NKT cell production of IL-4, but not IFN- γ , compared to α -GalCer-loaded control (non-treated with CpG-ODN) DCs in BALB/c mice. The CpG-DCs exhibited significantly higher expression of CD1d, CD80, CD86, and H2-D^d compared to that on control DCs. Neither single nor combinatorial treatment of cultures with anti-CD1d, CD80, CD86, or IL-12 mAbs showed significant effects on NKT cell-mediated IL-4 production induced by either type of DCs. Blocking of the H2-D^d and Ly49-receptor interaction during antigen presentation completely abolished the enhanced ability of the CpG-DCs to induce NKT cell production of IL-4. The DCs stimulated with Pam3CSK4 (P3C-DCs), a TLR2 ligand, also showed higher ability to induce IL-4 production by NKT cells than control DCs. However, the ability of P3C-DCs was modest compared to that of CpG-DCs. The H2-D^d level on P3C-DCs was lower than that on CpG-DCs, while no differences were detected in CD80 and CD86 expressions between CpG-DCs and P3C-DCs. In contrast, B6 mouse CpG-DCs, which express no H2-D^d, failed to induce substantial production of IL-4 by syngeneic NKT cells.

Discussion

NKT cells activated by DCs are thought to be the primary source of Th1/Th2 cytokines, especially in an early phase of immune responses, which may determine the subsequent type of acquired immunity. Thus, DC recognition of pathogens via TLR and PAMP interaction and the subsequent NKT cell activation appear to be crucial processes that lead to initiation of the appropriate acquired immunity. The present findings demonstrate that DC recognition of CpG motif leads to the enhanced IL-4 production by NKT cells via interaction of the augmented H2-D^d on the CpG-DCs with Ly49 receptors on NKT cells. Further investigation may develop an approach to apply this beneficial effects of manipulation of NKT cell activation in various autoimmune diseases.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 野 重 昭

副 査 教 授 小 野 江 和 則

副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

H2-D^d-mediated regulation of IL-4 production during natural killer T cell and dendritic cell interaction

(NKT 細胞と樹状細胞との会合における H2-D^d を介した IL-4 産生調節)

Natural killer T (NKT) 細胞は、T helper type 1 (Th1) サイトカインである interferon- γ (IFN- γ) と Th2 サイトカインである interleukin-4 (IL-4) を迅速かつ大量に産生し、生体防御反応の増強と自己免疫反応の制御という 2 つの機能を併せ持つ。樹状細胞 (dendritic cells, DC) は、ナイーブ T 細胞や NKT 細胞を活性化することのできる強力な抗原提示細胞であり、Toll like receptor (TLR) は DC による Th1・Th2 サイトカインバランス調節に重要な役割をはたしている。しかし、TLR を介した細胞外刺激が DC にどのような影響を与え、その後の NKT 細胞の活性化様式をいかに制御しているかについては不明な点が多い。

そこで本研究では、TLR9 のリガンドである CpG ODN により前処理された DC (CpG-DC) で NKT 細胞を刺激することにより、NKT 細胞からのサイトカイン産生の変化とそのメカニズムを検討した。DC を α -galactosylceramide と CpG ODN で前処理後、マウスナイロン非付着性脾細胞、もしくは胸腺細胞 (NKT 細胞ソース) と共培養し、上清中の IFN- γ 、IL-4 産生量を ELISA で測定したところ、コントロールと比較し、CpG-DC は NKT 細胞からの IL-4 産生のみを増強し、IFN- γ 産生には影響を与えないことが判明した。また、それは NKT 細胞内の intracellular staining によっても確かめられた。次に、そのメカニズムを解析するため、DC 上の表面分子をフローサイトメトリーにより調べた。その結果、DC を CpG ODN で刺激することにより、DC 上の CD1d、CD80、CD86、そして H2-D^d の発現が増強されることが判明した。そこで、これらの分子に対する抗体を加えこれらの共刺激をブロックし、NKT 細胞のサイトカイン産生を解析したところ、これらの分子の発現増強は今回の IL-4 産生増強には関与していないものと考えられた。そこで次に、NK 細胞や NKT 細胞上に発現している inhibitory receptor である Ly49 のリガンド、H2-D^d に対する抗体を加えてブロックしたところ、CpG-DC と共培養した NKT 細胞からの IL-4 産生増強が強く抑えられ、それは intracellular staining によっても確かめられた。次に、TLR2 のリガンドである Pam3CSK4 で前処理された DC (P3C-DC) が NKT 細胞からの IL-4 産生にどのような影響を与えるかも調べた。すると、P3C-DC は NKT 細胞からの IL-4 産生を増強したが、その効果は CpG-DC と比較して低かった。そこで CpG-DC と P3C-DC の細胞表面マーカーの発現を比較したところ、CD80、CD86 の発現には差がなかったのに対し、P3C-DC の H2-D^d 発現量は CpG-DC に比べ有意に低いことが判明した。以上より、CpG ODN は DC の H2-D^d 発現を増強し、NKT 細胞からの IL-4 産生を亢進することが考えられ、NKT 細胞と DC の相互作用によるサイトカインバランスの調節に H2-D^d とそのリガンド Ly49 の反応が関与していることが示唆された。

審査にあたっては、副査上出利光教授から (1) DC の cell line の成熟 DC の TLR9 と TLR2 の発現量に差があるかどうか、その発現量の差によりその後の signaling に差が出てきた可能性の有無について質問があり、その可能性は否定できないと思われるが、今回は TLR の発現量をみていないため、今後の検討が必要であると回答した。(2) ひとつの DC が H2-D^d を介して IFN- γ 、IL-4 両方に働きかけると考えるかについては、その可能性は高く、今回も H2-D^d と Ly49 の相互作用をブロックすることにより NKT 細胞からの IFN- γ の産生量が増加したことから、本来 DC には NKT 細胞からの IFN- γ 産生を増強する力があるものの、普段は H2-D^d によりそれが抑制されていることが考えられると回答した。

一方、副査小野江和則教授からは (1) CpG は何のバクテリア由来の成分かについての質問があり、TLR2 のリガンド、Pam3 は歯周病菌のリポ蛋白であるが、CpG は特定のバクテリアではなく、バクテリア全般と考えられると回答した。(2) TLR9 と TLR2 は細胞のどこに発現しているのかについては、TLR2 は細胞表面上に発現しているが、TLR9 は細胞質 endosome 内にあるため、その作用発現には抗原の内包化が必要であると回答した。(3) バクテリアの CpG がメチル化されているのかについては、バクテリアの CpG 配列はメチル化されていないと回答した。

また、主査大野重昭教授からは (1) *in vivo* の実験結果について質問があり、BALB/c、B6 マウスを用いて様々な実験を行ったが、*vivo* の場合様々な細胞が関与していることが考えられ、また、マウスの系によっても結果が異なり、今回の *vitro* のデータのようなクリアカットな結果は得られず、今後の検討課題と考えられると回答した。(2) ヒトの疾患と CpG との関連については、ヒトでは B 細胞、NK 細胞、単球、plasmacytoid DC などで TLR9 が発現しており、最近の報告では TLR9 の遺伝子の polymorphism とベーチェット病の感受性とは関連がないとの報告があり、また、活動性のヘルペス角膜炎患者の角膜や、アデノウイルスに感染したヒト角膜内皮細胞の TLR9 の発現量が増加しているとの報告があると回答した。(3) 今後 Th2 優位の疾患への応用の可能性については、サイトカイン産生調節を介して Th1/Th2 バランスをコントロールすることによりその可能性はあり、実際に Th2 優位の疾患である喘息が CpG の投与で抑制されたとの報告もあるが、今回の実験結果は *in vitro* のマウスの結果であるので、実際の臨床応用に至るまでは多くのハードルを越える必要があると回答した。

この論文は、NKT 細胞と DC の相互作用によるサイトカインバランスの調節に H2-D^d とそのリガンド Ly49 の反応が関与していることを初めて報告した点で高く評価され、今後のさらなる研究により、様々な自己免疫疾患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。