

学位論文題名

Decrease of peripheral and intestinal NKG2A-positive T cells in patients with ulcerative colitis

(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)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】腸管には多数の免疫細胞が存在しており、それらは常時外部から多数の刺激を受けている。通常、腸管の免疫反応は抗原に対する免疫応答と宿主に対する障害を抑制する機能との間でバランスが調整され、炎症が制御された状態に保たれている。炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease、以下 IBD と略す) は慢性的かつ再燃性の腸管炎症が特徴的である疾患であり、潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis、以下 UC)、クローン病 (Crohn's disease、以下 CD) が代表的な疾患として挙げられる。これらの疾患は感染や環境、遺伝等により影響を受け、腸管内病原体に対する免疫防御機能と炎症反応のバランスが崩れることで生じると考えられている。NK 細胞は自然免疫の主要因子として働く細胞傷害性リンパ球の一種であり、サイトカインやケモカインを産生し抗体依存性、非依存性の細胞傷害機能を有する。NK 細胞の自己寛容性は MHC クラス I 分子と抑制性 NK レセプター (inhibitory natural killer receptors、以下 iNKR) の結合により誘導されるが、iNKR は T 細胞の一部のサブセットにも発現しており、T 細胞上に発現した iNKR は抗原を介した T 細胞の細胞傷害活性やサイトカインの放出を抑制させることで免疫反応を調整していると考えられている。しかしながら、IBD の病態と iNKR 発現 T 細胞の関連性を検討した報告はこれまでない。本研究では、IBD における iNKR の病態関連性を明らかにする目的で、iNKR の 1 つである NKG2A 発現 T 細胞に関して、代表的な腸炎モデルである Dextran sulfate sodium (以下 DSS) 腸炎モデルマウス及び UC 患者の末梢血、腸管内単核球を用いた解析を行った。

【材料と方法】8~10 週齢のオスの Balb/C マウスに、腸炎を発症させるため蒸留水で調整した 3% または 5% のデキストラン硫酸ナトリウム (dextran sulfate sodium, DSS) 水溶液を 7 日間自由飲水させた。コントロールとして同週齢のマウスに通常の蒸留水を飲水させた。末梢血単核球および大腸の粘膜固有層内単核球の NKG2A+ T 細胞について解析するため、末梢血単核球および大腸粘膜固有層内単核球を DSS 投与 0、7、10、14、21、28 日目に採取しフローサイトメトリーで検討を行った。抗 NKG2A 抗体を用いたブロッキングには 5% DSS 経口投与の 3 日前、当日、3 日後の 3 時点で 300 μ g の抗 NKG2A 抗体もしくはコントロールとしての抗 IgG 抗体をマウスの腹腔内に注入し腸管の組織学的検討を行った。UC 患者 20 例、CD 患者 16 例および健康コントロール (healthy control、以下 HC と略す) 23 例より末梢血を採取しフローサイトメトリーで検討を行った。免疫染色には、UC 6 例と CD 5 例の生検検体と手術検体を用いた。同様に、正常腸管組織として 7 例の大腸癌患者の手術検体の正常部分を用いた。

【結果】DSS 腸炎マウスの炎症期において、末梢血中の NKG2A+ T 細胞は減少し、反対に腸管では増加していた。また、DSS 腸炎マウスに抗 NKG2A 抗体を投与すると腸管の炎症

集が増加した。以上の結果から、NKG2A+ T 細胞は腸管の炎症部位に集積し、炎症反応に対し抑制的に作用している可能性が示唆された。ヒト IBD および HC 検体を用いた解析では UC 患者において、臨床所見に関係無く CD 患者や健常者に比べて末梢血中の NKG2A+ T 細胞が減少していた。また、ヒト腸管に分布する NKG2A+ T 細胞を検討した結果では、UC 患者では腸管においても NKG2A+ T 細胞が減少していた。

【考察】NKG2A+ T 細胞は、TCR 刺激の閾値の上昇、サイトカイン産生の抑制、細胞傷害活性の減弱により T 細胞の免疫反応を調整すると考えられている。本研究では、DSS 腸炎マウスにおいて腸炎の炎症期では腸管内 NKG2A+ T 細胞の割合は増加し、炎症改善後には DSS 投与前の程度まで減少するという NKG2A+ T 細胞が腸管局所で顕著な変化を示すことがわかった。炎症期における NKG2A+ T 細胞の増加に関しては、末梢から腸管に NKG2A+ T 細胞が移動する、あるいは局所での増殖等の機序が考えられるが、末梢血においては炎症活動期において NKG2A+ T 細胞の割合は減少するが、DSS 投与を中止し腸炎が改善するにつれ次第にその割合は上昇した。DSS 腸炎は腸管傷害の急性期の簡易的なモデルであり、このように末梢血及び腸管において NKG2A+ T 細胞がダイナミックな変化をすることは DSS によって惹起された粘膜障害に対する免疫反応を反映している可能性があると考えられる。DSS 腸炎マウスに抗 NKG2A 抗体を投与することで腸管粘膜の炎症集が増加する傾向が認められたことから、iNKR の免疫学的機能を考えると、NKG2A+ T 細胞は傷害を受けた腸管に集められ、免疫の過剰な反応から生じる組織障害を防ぐために機能している可能性が考えられる。ヒトでは自己免疫疾患、悪性腫瘍等において、NKG2A+ T 細胞が病態に関わっている報告があり、炎症調節機能を有する NKG2A+ T 細胞が低下することが、炎症過剰状態の要因の 1 つになっていることが推定される。その一方で、NKG2A+ T 細胞の増加は T 細胞による不完全な細胞傷害活性を誘導することにもなり得ると考えられる報告も出ている。以上より、ヒト NKG2A+ T 細胞はマウスと同様に免疫調節機能を有し、主に免疫応答を抑制する機能を有していることが推定される。UC における免疫異常を考える上で、本研究で明らかになった興味深い点は、UC 患者では NKG2A+ T 細胞が末梢血のみならず炎症局所の腸管粘膜固有層においても減少していたことである。これは DSS 腸炎モデルマウスにおいて NKG2A+ T 細胞が炎症期に腸管に集積していた現象と相反している。iNKR を発現した T 細胞は免疫抑制能があることを考えると、腸管において NKG2A+ T 細胞が減少することが局所での過剰な炎症反応を誘導し、UC の病態に関与している可能性が考えられるが確定には至っておらず、今後の検討課題と考えられる。

【結論】今回の研究で、DSS 腸炎マウスにおいて炎症期に末梢血中の NKG2A+ T 細胞の割合が減少し大腸粘膜固有層中の NKG2A+ T 細胞の割合が増加していること、NKG2A+ T 細胞は腸炎の炎症抑制作用を有すると推定されること、UC 患者において CD 患者や HC と比較して末梢血、大腸粘膜固有層の NKG2A+ T 細胞の割合が減少していることが示された。これらの結果から NKG2A+ T 細胞は過剰な炎症反応を抑制する免疫制御作用を有しており、UC 患者では NKG2A+ T 細胞が減少しているために適切な免疫応答の調節が行えず、慢性・持続性の腸炎を発症している可能性が考えられた。NKG2A+ T 細胞の炎症抑制機能について検討を深め、更に NKG2A+ T 細胞を量的・質的にコントロールをすることが可能となれば、新たな治療戦略につながる可能性があると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 清 野 研 一 郎
副 査 教 授 坂 本 直 哉
副 査 准 教 授 神 山 俊 哉
副 査 教 授 志 田 壽 利

学位論文題名

Decrease of peripheral and intestinal NKG2A-positive T cells in patients with ulcerative colitis

(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)

炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease、以下 IBD) は慢性・反復性に腸管の炎症が生じる病態のことを指し、疾患として潰瘍性大腸炎とクローン病が含まれる。これらの疾患は感染や環境、遺伝等により影響を受け、腸管内病原体に対する免疫防御機能と炎症反応のバランスが崩れることで生じると考えられているが、その病態で知られていることはごくわずかである。抑制性 NK レセプター (inhibitory natural killer receptors、以下 iNKR) は T 細胞の一部のサブセットにも発現しており、免疫反応を調整していると考えられている。本論文は、IBD における iNKR の病態関連性を明らかにする目的で、iNKR の 1 つである NKG2A 発現 T 細胞に関して、IBD の疾患モデルとされるデキストラン硫酸ナトリウム (dextran sulfate sodium、以下 DSS) 腸炎マウス及びヒト潰瘍性大腸炎患者における末梢血、腸管粘膜固有層中の NKG2A 陽性 T 細胞についての検討を行ったものである。DSS 腸炎マウスでの NKG2A 陽性 T 細胞の割合は、末梢血においては腸炎の極期で減少しており、症状の改善に伴って増加していた。腸管粘膜固有層においては NKG2A 陽性 T 細胞は腸炎の極期で増加するが腸炎改善時には DSS 投与前の程度まで元に戻っていることがわかった。また、抗 NKG2A 抗体を腹腔内投与し DSS を飲水させたマウスでは組織学的に検討したところ、抗 IgG 抗体を投与したコントロール群のマウスと比較して腸管の炎症巣の数が多いことがわかった。また、潰瘍性大腸炎の患者では末梢血及び腸管粘膜固有層の両方において健常者、クローン病の患者と比較して NKG2A 陽性 T 細胞の割合が減少していることがわかった。さらに、潰瘍性大腸炎患者末梢血中の NKG2A 陽性 T 細胞はステロイド投与の

有無や腸管切除の有無、疾患活動性の有無、腸管の炎症範囲といった臨床状態に関係なく減少していることがわかった。今回の研究で、DSS 腸炎マウスにおいて炎症期に末梢血中の NKG2A+ T 細胞の割合が減少し大腸粘膜固有層中の NKG2A+ T 細胞の割合が増加していること、NKG2A+ T 細胞は腸炎の炎症抑制作用を有すると推定されること、UC 患者において CD 患者や HC と比較して末梢血、大腸粘膜固有層の NKG2A+ T 細胞の割合が減少していることが示された。これらの結果から NKG2A+ T 細胞は過剰な炎症反応を抑制する免疫制御作用を有しており、UC 患者では NKG2A+ T 細胞が減少しているために適切な免疫応答の調節が行えず、慢性・持続性の腸炎を発症している可能性が考えられた。

審査会では、学位論文内容の発表後、副査志田教授より TCR γ δ 陽性細胞、CD56 陽性細胞の機能と役割について、DSS 腸炎で他に腸炎を制御する作用を持つ CD4 等の存在はあるのかということ、副査坂本教授より潰瘍性大腸炎患者で疾患の寛解期と活動期の両方で NKG2A 陽性 T 細胞の割合が低値であることの意味、実験対象とした潰瘍性大腸炎患者の臨床的背景について、副査神谷准教授より対象とした潰瘍性大腸炎患者での癌罹患の有無、クローン病患者で NKG2A 陽性 T 細胞の割合が低下しているヒトが含まれる事の意味について、主査清野教授からは抗 NKG2A 抗体として用いた抗体は NKG2A 特異的なものを用いたのか否か、についての質問があり、申請者は得られた研究データや文献的な知見を引用し、概ね妥当に回答した。

この論文は、未だ解明されていない潰瘍性大腸炎について疾患の病態メカニズムを明らかにする重要な手掛かりを提起したといった点で高く評価され、今後の病態解明や治療法の開発などにつながることを期待される。

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。