

論文内容の要旨

論文題目

非寛解サルコイドーシス患者における V α 24V β 11 NKT 細胞の減少および活性化障害

指導教官 浅野 茂隆 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 小林 誠一郎

背景 サルコイドーシスは、病理学的特徴として非乾酪性の肉芽腫を認め、呼吸器を中心として侵襲する全身性の疾患である。一般的に肉芽腫形成は、多様な抗原に対する生体の防御反応と考えられる。サルコイドーシスの原因抗原は未だ確定されていないが、最近、*Propionibacterium acnes* あるいは *Propionibacterium granulosum* が注目されている。サルコイドーシスの肉芽腫形成では、1. マクロファージ、リンパ球が標的臓器に浸潤し、マクロファージが集積して類上皮細胞あるいは多核巨細胞に分化する。2. 主に Th1 (T helper 1) 型リンパ球がその周囲を取り囲むことにより肉芽腫を完成する。

最近、同様の肉芽腫形成疾患である結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 感染においてマウス V α 14 NKT 細胞が感染防御に重要な役割をしていることが報告された。つまり V α 14J α 281 ノックアウトマウス (NKT 細胞欠損マウス) では、結核菌より調整した脱タンパク化した菌体成分を投与しても肉芽腫形成が起こらない。V α 14 NKT 細胞の活性化が Th1 型反応を誘起し、IFN- γ 等の Th1 型サイトカインの産生により肉芽腫産生を誘導し、結核菌に対する抵抗性に関与していると考えられる。

V α 14 NKT 細胞は、NK 細胞の表面マーカーである NK1.1, 均一な抗原受容体 α 鎖 V α 14J α 281, 限られた V β レパートリー (主に V β 8.2) によって特徴づけられる。V α 14 NKT 細胞は多形性のない MHC 様 class Ib 分子である CD1d 拘束性に、 α -アノマーのガラクトースをもつ糖セラミドである α -ガラクトシルセラミド (α -galactosylceramide; α -GalCer) を認識する。活性化された V α 14 NKT 細胞は IFN- γ , IL-4 両方を産生する。ヒトにおいてマウス V α 14 NKT 細胞に相当するものは V α 24V β 11 NKT 細胞である。マウス同様、ヒト NKT 細胞も CD1d 拘束性に α -GalCer によって活性化される。ヒト NKT 細胞

も抗腫瘍免疫, アレルギー反応, 自己免疫疾患, 感染症等様々な免疫反応において、重要な役割をすると考えられている。

現在までの多くの研究では、サルコイドーシスにおける免疫反応の解析に、T 細胞, マクロファージ等に焦点を当てて行われてきた。しかしヘルパー T 細胞の分化を制御し、同様の肉芽腫形成疾患である結核においてもその関与が考えられている V α 24V β 11 NKT 細胞の研究は全く行われていない。このレポートではフローサイトメトリー, single cell reverse transcription polymerase chain reaction (single-cell RT-PCR), 定量的 RT-PCR 等により末梢血中の V α 24V β 11 NKT 細胞の割合, 機能を、寛解, 非寛解サルコイドーシス患者, 健常人について解析し、非寛解サルコイドーシス患者において末梢血 V α 24V β 11 NKT 細胞の減少と活性化障害が示唆されたので報告する。**材料と方法, 結果** サルコイドーシス患者群 43 人と健常対照群 22 人について解析した。30 人の患者は、サルコイドーシスと診断後無治療で治癒あるいは寛解した。これらの患者を寛解群と定義した。13 人の患者は、現在まで胸部 X 線写真上改善, 悪化を繰り返すか、悪化を続ける所見が認められた。これらの患者を非寛解群と定義した。

まず末梢血中のリンパ球を FITC 付加抗 TCR V α 24 抗体, PE 付加抗 TCR V β 11 抗体, CyChrome 付加抗 CD3 ϵ 抗体にて染色し、フローサイトメトリーにより解析した (Figure 1.)。末梢血リンパ球中の V α 24V β 11 NKT 細胞の割合, 絶対数は、寛解群と健常対照群間では有意差を認めなかったが、非寛解群では健常対照群と比較して減少していた (Figure 2.)。CD3⁺ T 細胞の割合は、各群間で有意差を認めなかった。CD3⁺ T 細胞中の V α 24V β 11 NKT 細胞の割合は寛解群と健常対照群間では有意差を認めなかったが、非寛解群では健常対照群と比較して減少していた。

非寛解群における V α 24V β 11 NKT 細胞の減少の原因を調べるため、NKT 細胞の特異的なリガンドである α -GalCer を使って、CD1d による抗原提示能を検討した。マグネティックセルソーティングによって CD3⁻ 細胞を回収し、 α -GalCer または vehicle と反応後、放射線照射し抗原提示細胞として使用した。レスポンドーとして、V α 14 NKT 細胞以外のリンパ球を認めない recombination activating gene-1 (RAG-1) ノックアウト V α 14V β 8.2 ダブルトランスジェニックマウスを使用し、増殖反応の測定をしたところ、非寛解群において抗原提示能の障害を認めなかった。この結果 V α 24V β 11 NKT

細胞の減少の原因は、抗原提示細胞側ではなく NKT 細胞それ自身にあると考えられた。

そこで 1 細胞レベルで、V α 24 V β 11 NKT 細胞が機能障害を有しているかを検討するため、固相化抗 CD3 ϵ 抗体刺激 V α 24 V β 11 NKT 細胞を、single-cell ソーティングした後 RT-PCR を行いサイトカイン産生を検討した。TCR V α 24 陽性サンプル中の IFN- γ 陽性サンプルの割合を解析した。非寛解群では寛解群に比べて、IFN- γ 産生 V α 24 V β 11 NKT 細胞の割合が減少していた (Figure 3.)。

次に、培養し増殖させた V α 24 V β 11 NKT 細胞を PMA, イオノマイシンで刺激後、産生される IFN- γ と GAPDH を定量的 RT-PCR にて測定した。各サンプルについて検量線から計算した IFN- γ のコピー数を GAPDH のコピー数で割り、NKT 細胞による IFN- γ の産生量とした。非寛解群では寛解群、健常対照群に比べて、V α 24 V β 11 NKT 細胞による IFN- γ 産生量が減少していた (Figure 4.)。IL-4 についても同様に解析したが、各群間で有意差を認めなかった (Figure 4.)。また PMA, イオノマイシン刺激 CD4⁺ T 細胞の IFN- γ , IL-4 産生を細胞内サイトカイン染色により解析した。各群間で CD4⁺ T 細胞中の IFN- γ , IL-4, IFN- γ + IL-4 産生細胞の割合に有意差を認めなかった。

考察 サルコイドーシスの原因は不明であるが、何らかの抗原に対する生体の防御反応として、肉芽腫が形成される可能性が有力である。今回の研究では結核菌感染と同様の肉芽腫形成疾患におけるサルコイドーシスにおいて、非寛解群において末梢血リンパ球中の V α 24 V β 11 NKT 細胞の減少を認め、サルコイドーシスにおける NKT 細胞の関与が示唆された。NKT 細胞が肉芽腫形成に必要であるとすると、肉芽腫形成が持続している非寛解群で NKT 細胞が減少していることは矛盾しているようにも見える。これに対しては、以下のような説明が 1 つの可能性として考えられる。マウス結核菌感染モデルでは、肉芽腫形成の際 Th1 型反応が起こり、V α 14 NKT 細胞は Th1 型反応を誘起する役割を持つと考えられている。サルコイドーシス非寛解群においては、V α 24 V β 11 NKT 細胞の減少と IFN- γ の産生抑制のため、主な肉芽腫形成部である肺間質部において十分な Th1 型反応を誘導できず、抗原を排除できない結果 Th1 型反応が持続し肉芽腫形成が持続するという機序である。

以上、サルコイドーシス非寛解群において、末梢血中の V α 24 V β 11 NKT 細胞の減少と IFN- γ 産生能の減少が認められ、NKT 細胞の活性化障害が示唆された。

Figure 1.

フローサイトメトリーによる末梢血NKT細胞の解析

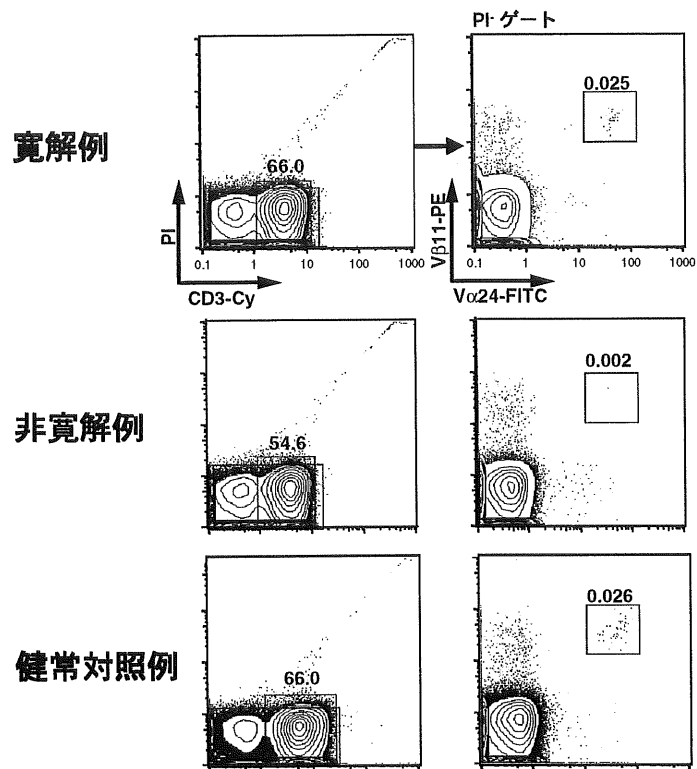


Figure 2.

末梢血におけるNKT細胞の割合、絶対数

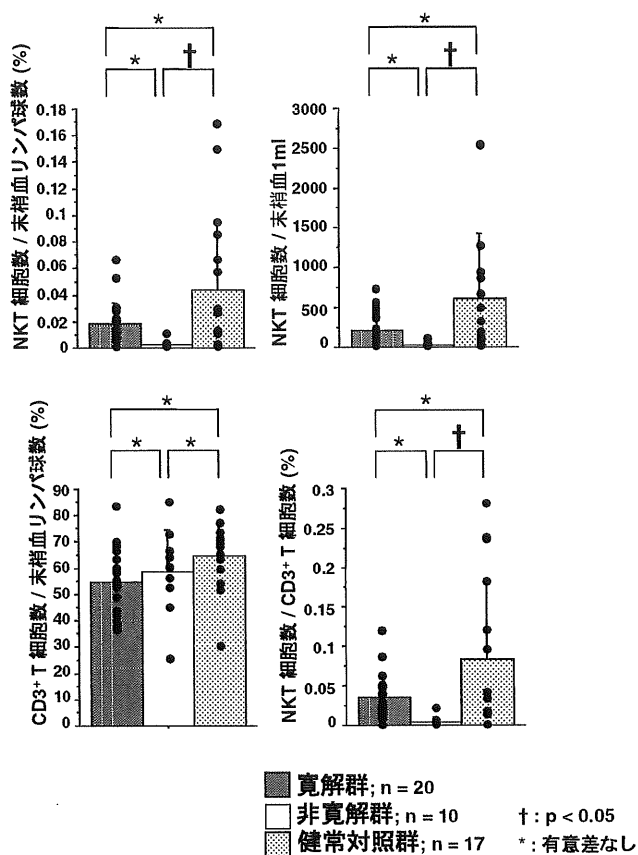


Figure 3.

Single-cell RT-PCRにより解析したNKT細胞のIFN- γ 産生能

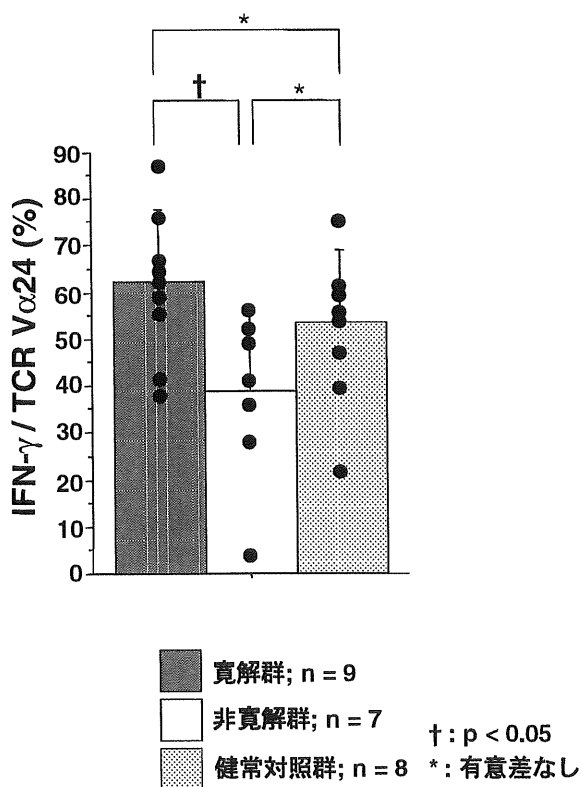


Figure 4.

定量的RT-PCRにより解析したNKT細胞のIFN- γ , IL-4産生能

