

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 小林 誠一郎

本研究は、ヒト肉芽腫形成疾患であるサルコイドーシスにおいて、最近第 4 のリンパ球として新たに同定されたヒト V α 24 V β 11 NKT 細胞の役割について解析したものである。

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。サルコイドーシスの原因は未だ確定されていないが、何らかの抗原に対する生体防御反応として肉芽腫が形成されると考えられている。同様の肉芽腫形成疾患であるマウス結核菌感染モデルにおいて、マウス V α 14 NKT 細胞が肉芽腫形成に必須であることが報告されている。サルコイドーシスにおいても V α 24 V β 11 NKT 細胞の関与が考えられたため解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. 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。サルコイドーシス患者群については胸部 X 線写真から、寛解群 (30 人) と非寛解群 (13 人) に分類した。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。末梢血リンパ球中の V α 24 V 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有意に減少していた (寛解群; $0.019 \pm 0.016\%$, $n = 20$, 非寛解群; $0.002 \pm 0.003\%$, $n = 10$, 健常対照群; $0.044 \pm 0.052\%$, $n = 17$)。末梢血 1ml あたりの V α 24 V β 11 NKT 細胞の絶対数についても同様の傾向を認めた。
2. 1. の原因として、抗原提示細胞側の機能障害の可能性をまず考えた。NKT 細胞の特異的なリガンドで糖セラミドである α -ガラクトシルセラミド (α -galactosylceramide; 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 か 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 14 V 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 24 V 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。

3. そこで1細胞レベルで、V α 24V 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 24V 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 24V β 11 NKT細胞の割合が有意に減少していた(寛解群; $62.2 \pm 15.4\%$, n = 9, 非寛解群; $38.9 \pm 18.0\%$, n = 7, 健常対照群; $52.6 \pm 16.0\%$, n = 8)。
4. 次に培養し増殖させたV α 24V 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 24V β 11 NKT細胞によるIFN- γ 産生量が有意に減少していた(寛解群; 0.904 ± 0.537 , n = 7, 非寛解群; 0.082 ± 0.029 , n = 8, 健常対照群; 0.984 ± 0.348 , n = 8)。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。
5. 以上より、サルコイドーシス非寛解群において、末梢血中のV α 24V β 11 NKT細胞の減少とIFN- γ 産生能の減少を認め、NKT細胞の活性化障害が示唆された。マウス結核菌感染モデルにおける肉芽腫形成では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 24V 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、という機序が1つの可能性として考えられた。

以上、本研究はサルコイドーシスの研究においてこれまで焦点を当てられていなかったV α 24V β 11 NKT細胞について、その病態における関与の可能性を示したと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。