

論文の内容の要旨

論文題目 CD4⁺CD25⁺ 抑制性 T 細胞による
V α 24NKT 細胞に対する抑制効果に関する研究

指導教官 北村唯一教授

東京大学大学院医学系研究科

平成12年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 東 剛司

【研究の背景】

CD4⁺CD25⁺ 抑制性 T 細胞は免疫抑制性の T 細胞であり、末梢血の CD4⁺ T 細胞の 5-10%を占め、T 細胞受容体を介する刺激により CD4⁺CD25⁻ T 細胞の増殖能を抗原非特異的に抑制することが報告されている。この抑制の機序は詳細には解明されていないが、サイトカイン(IL-10、TGF- β 等)などの液性因子ではなく、細胞間直接接触に依存していることが報告されている。さらに腫瘍免疫においても重要な位置を占め、マウス の担癌モデルにおいて CD4⁺CD25⁺ 抑制性 T 細胞の除去により抗腫瘍作用の増強が報告されている。

一方 V α 24NKT 細胞は、多型性の無い T 細胞受容体(V α 24-J α 18)と NK 受容体を発現し、CD1d 拘束性に糖脂質 (α -galactosylceramide: α -GalCer) を抗原として認識する細胞である V α 24NKT 細胞には V α 24⁺V β 11⁺CD4⁻CD8⁻、V α 24⁺V β 11⁺CD4⁺、V α 24⁺V β 11⁺CD8⁺NKT の 3 つの subset が存在し、異なったサイトカイン産生パターンを呈することが報告されている。さらにヒト V α 24NKT 細胞のマウスホモログである V α 14NKT 細胞の解析により NKT 細胞が腫瘍免疫に重要であることが報告され、癌に対する免疫療法への応用が注目されている。

近年 CD4⁺CD25⁺ 抑制性 T 細胞の抑制作用は CD4⁺ T 細胞を対象とされ、CD4⁺ T 細胞以外の細胞については解析されてこなかった。本研究では、CD4⁺CD25⁺抑制性 T 細胞の V α 24NKT 細胞の各サブセットに対する抑制作用について細胞増殖能、サイトカイン産生、細胞傷害活性について評価し、さらにその機序を解析することを目的とした。

【方法】

1. 細胞の作製

CD4⁺CD25⁺ 抑制性 T 細胞：健常人末梢血より比重遠心法にて末梢血単核球 (PBMCs) を分離し、さらに張り付き法にて単球を除去した。このようにして得られたリンパ球成分を抗体のカクテル (抗 CD8、14、19、56、DR 抗体) と反応後磁気ビーズ法による negative selection にて CD4⁺ T 細胞を分離した。さらに CD4⁺ T 細胞を抗 CD25 抗体を用い磁気ビーズ法にて CD4⁺CD25⁺ 抑制性 T 細胞を採取した。

V α 24NKT 細胞：健常人より分離した単球を rhIL-4 (500 U/ml)、rhGM-CSF (500 U/ml) 下にて 5 日間培養し単球由来樹状細胞 (Monocyte-derived Dendritic Cell: MoDC) を作製し、 α -GalCer を添加しさらに 12 時間培養した。末梢血より抗 V α 24 抗体を用い磁気ビーズ法にて V α 24 細胞を分離し rhIL-2 (40 U/ml) 下にて培養、前述の α -GalCer を添加した MoDC で 7 日毎に刺激を加えた。このようにして作製した V α 24NKT 細胞を FACS Vantage にて V α 24⁺V β 11⁺CD4⁻CD8⁻、V α 24⁺V β 11⁺CD4⁺、V α 24⁺V β 11⁺CD8⁺NKT の各 subset に分離した。

2. Flow cytometry による細胞表面抗原の解析

細胞表面抗原は特異的抗体による免疫蛍光染色を行った後、Flow cytometry にて解析した。

3. CD4⁺CD25⁺ 抑制性 T 細胞による V α 24NKT 細胞の細胞増殖能の抑制

細胞の増殖能の測定にはリンパ球混合試験 (mixed lymphocyte reaction: MLR) を用いた。1 \times 10⁵ 個の V α 24NKT 細胞の各 subset に刺激として α -GalCer を添加し放射線照射した 5 \times 10⁴ 個の MoDC を加え 72 時間培養後、1 μ Ci [³H]TdR 添加し 12 時間培養後、 [³H] の取り込みをシンチレーターにて測定した。また CD4⁺CD25⁺ 抑制性 T 細胞による抑制を評価するため、さまざまな細胞数の CD4⁺CD25⁺ 抑制性 T 細胞を加えた。

4. CD4⁺CD25⁺ 抑制性 T 細胞による V α 24NKT 細胞のサイトカイン産生能の抑制

前述の細胞増殖能の評価系にて [³H] の添加直前の上清 200 μ l 採取し ELISA 法にてサイトカイン濃度を測定した。

5. Transwell を用いた実験

1 \times 10⁵ 個の V α 24NKT 細胞に刺激として α -GalCer を添加した 5 \times 10⁴ 個の MoDC を放射線照射後加えた。さらに 1 \times 10⁵ 個の CD4⁺CD25⁺ 抑制性 T 細胞を直接ある

いは Transwell に加え 72 時間培養後、1 μ Ci [3 H]TdR 添加しさらに 12 時間培養後 [3 H] の取り込みをシンチレーターにて測定した。

6. CD4 $^+$ CD25 $^+$ 抑制性 T 細胞による V α 24NKT 細胞の細胞傷害活性の抑制

細胞傷害活性の測定には 51 Cr 放出試験を用いた。標的細胞として Na $_2^{51}$ CrO $_3$ (Amersham, Arlington Heights, IL) にてラベルした 5x10 3 個の細胞 (MOLT-4、Jurkat 細胞) を 1 \times 10 5 個の V α 24NKT 細胞と 96 穴の丸底ウェルプレートにて 4 時間培養後、上清を 100 μ l 採取しシンチレーターにて測定した。特異的 51 Cr 放出量の計算には以下の式を使用した。[(cpm experimental release - cpm spontaneous release) / (cpm maximal release - cpm spontaneous release)] x 100

【結果】

V α 24NKT 細胞は α -GalCer 特異的な細胞増殖能を有する。CD4 $^+$ CD25 $^+$ 抑制性 T 細胞は V α 24NKT 細胞の増殖能を抑制することが MLR によって確認された。この抑制は CD4 $^+$ CD25 $^+$ 抑制性 T 細胞数依存性に増強し、V α 24 $^+$ V β 11 $^-$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ 、V α 24 $^+$ V β 11 $^+$ CD4 $^+$ 、V α 24 $^+$ V β 11 $^+$ CD8 $^+$ NKT の各 subset 間において差を認めなかった。さらに V α 24NKT 細胞は以前の報告どおり、さまざまなサイトカイン (INF- γ 、IL-4、IL-13、IL-10) を産生し、その産生パターンは各 subset により異なる。INF- γ は全ての subset で産生される。一方 IL-4 は V α 24 $^+$ V β 11 $^-$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ 、V α 24 $^+$ V β 11 $^+$ CD4 $^+$ において産生され、IL-13、IL-10 は V α 24 $^+$ V β 11 $^+$ CD4 $^+$ において産生される。CD4 $^+$ CD25 $^+$ 抑制性 T 細胞との共培養により ELISA でサイトカイン産生の抑制が確認された。この抑制はサイトカインあるいは subset 間では差は認めなかった。

次に、CD4 $^+$ CD25 $^+$ 抑制性 T 細胞の抑制の機序を解析した。抑制の機序として液性因子 (IL-10、TGF- β 等) と細胞間直接接触が考えられている。まず抗 IL-10 抗体、抗 TGF- β 抗体を用い、CD4 $^+$ CD25 $^+$ 抑制性 T 細胞の V α 24NKT 細胞に対する細胞増殖の抑制作用を検討した。CD4 $^+$ CD25 $^+$ 抑制性 T 細胞による抑制作用はこれらの抗体で阻害されなかった。次に抗 ICAM-1 抗体、transwell を用い細胞間直接接触を検討した。これらにより CD4 $^+$ CD25 $^+$ 抑制性 T 細胞の抑制作用は阻害された。さらに CD4 $^+$ CD25 $^+$ 抑制性 T 細胞の MoDC に対する作用をフローサイトメトリーによって CD40、54、80、86、HLA-DR、CD1d の発現を評価した。CD4 $^+$ CD25 $^+$ 抑制性 T 細胞との共培養により MoDC 細胞表面上のこれらの分子の発現低下は認められなかった。

V α 24NKT 細胞は急性 T 細胞白血病由来の細胞株である MOLT-4、Jurkat に細胞

障害活性を有する。CD4⁺CD25⁺ 抑制性 T 細胞による Vα24NKT 細胞のこの抗腫瘍効果への影響を解析した。CD4⁺CD25⁺ 抑制性 T 細胞との共培養により Vα24NKT 細胞の MOLT-4、Jurkat に対する細胞障害活性は阻害された。

【考察および結語】

Vα24NKT 細胞のα-GalCer 特異的な増殖能、サイトカイン産生は CD4⁺CD25⁺ 抑制性 T 細胞により抑制された。この抑制作用は Vα24⁺Vβ11⁺CD4⁻CD8⁻、Vα24⁺Vβ11⁺CD4⁺、Vα24⁺Vβ11⁺CD8⁺NKT 細胞の各 subset 間において差は認められなかった。抑制作用の機序としては、MoDC の刺激分子の発現の低下を認めなかったこと、抗 IL-10 抗体、抗 TGF-β 抗体にて阻害されなかったこと、抗 ICAM-1 抗体、transwell の実験にて抑制作用が阻害されたことより、液性因子ではなく CD4⁺CD25⁺ 抑制性 T 細胞と Vα24NKT 細胞との細胞間直接接触に依存していると考えられた。さらに Vα24NKT 細胞の抗腫瘍効果を抑制することが MOLT-4、Jurkat に対する細胞傷害活性が抑制された。これらの結果は Vα24NKT 細胞を用いた細胞免疫療法の開発に有意義と考えられた。