

論文の内容の要旨

論文題目 Functional characterization of human invariant NKT cells:
Therapeutic potential of a subset of CD4⁺ invariant NKT cells selectively producing interleukin-5 through synergistic effect of interleukin-2 and T cell receptor signaling in multiple sclerosis

和訳 ヒト invariant NKT 細胞の機能解析: 多発性硬化症との関連

指導教員 辻 省次 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

作石かおり

多発性硬化症 (multiple sclerosis MS)は、自己免疫疾患の一つとされ、治療にステロイドなどが用いられるが、その効果は十分とは言えず、病勢がコントロールされず日常生活を送ることが不自由になってしまう患者も多い。さらに的確な治療が求められている。近年、多発性硬化症の疾患モデルとされる実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis EAE) で、様々な調節性細胞の異常により、Th1 偏倚を介した病態の悪化がもたらされることが明らかになってきている。このような細胞として NKT 細胞が挙げられ、MS の治療標的の一つとして有力視されている。

CD1d 拘束性 NKT 細胞は、CD1d 分子に結合した糖脂質を認識し、速やかに Th1 サイトカインおよび Th2 サイトカインのいずれをも大量に産生する能力をもつ特異的なリンパ球である。この特異的な性質を持つがゆえ、自然免疫と受動免疫を結ぶ調節性細胞として働くと考えられている。EAE 以外にも I 型糖尿病、関節リウマチなど自己免疫動物モデルで、NKT 細胞が病態に関与することが報告されている。また、ヒトにおいても、当研究室にて多発性硬化症の寛解期には CD4 陽性 NKT 細胞が Th2 サイトカインを産生しやすくなっていることが見出され、寛解維持に関わっている可能性が示された。しかし、NKT 細胞の多

彩なサイトカイン産生能が実際に体内で生理学的にどのように調整されているか、ほとんど明らかでない。

近年、細菌感染時に NKT 細胞は内因性抗原を認識し、lipopolysaccharide (LPS) と Tole like receptor (TLR) 4 の結合を介して樹状細胞(dendritic cell DC)により産生される IL-12 の刺激のもと、Th1 サイトカインを選択的に産生し、抗細菌作用を呈することが報告された。ここで、初めて NKT 細胞の内因性抗原の認識はその免疫反応の機序に関与している例が示された。

一方、Th2 サイトカインを選択的に産生させる因子については OCH などの合成糖脂質による刺激が知られているのみである。

そこで、今回、細菌感染時と同様に、内因性抗原を認識している NKT 細胞が、何らかのサイトカインの存在下で、Th2 サイトカインを選択的に産生し、制御性に働くのではないかと考えた。これを検討するためすなわち、ヒト CD4 陽性 NKT 細胞ラインを樹立し、炎症時に活性化 T 細胞などより大量に産生される T 細胞増殖因子として知られる IL-2 に着目して、CD1d 陽性細胞存在下で NKT 細胞に与える影響を解析した。

<方法>

健常者 9 人、多発性硬化症患者 13 人より分離した末梢血単核球細胞 (peripheral blood mononuclear cell PBMC) に、NKT 細胞のリガンドである α -galactosylceramide (α GC)、もしくは合成糖脂質である OCH を添加した。増えた CD4 陽性 NKT 細胞は、V α 24 陽性 V β 11 陽性 CD4 陽性 CD8 陰性として cell sorting をおこない、phytohemagglutinin (PHA) にて刺激増殖させた。以後、定期的に cell sorting と PHA 刺激を繰り返し、ほぼ 97% 以上の純度の NKT 細胞が得られた。この、CD4 陽性 NKT 細胞を用いて、健常者の CD14 陽性単球より IL-4/ GM-CSF で誘導した DC を抗原提示細胞 (antigen presenting cell; APC) として、IL-2 存在下および非存在下にて 48 時間培養した。上清中のサイトカインを Cytometric Beads Array を用いて測定した。

なお、細胞解析を行うことについて十分な説明を行い、文書による同意を得て行った。

<結果>

健常者(healthy subject HS)より 9 ライン、多発性硬化症患者(MS)より 15 ラインが得られた。そのうち各々約 30% のラインに、IL-2 存在下で抗原を添加することなく著明な IL-5 産生を認めた。 α GC 刺激時とは異なり、いずれも IFN γ の産生量は IL-5 に比して低く、明らかな Th2 に偏倚したサイトカインプロファイルを呈していた (図参照)。また、IL-5 の産生量は α GC 刺激時に匹敵もしくは超えるような著明な量であった。HS と MS において、このような NKT 細胞ラインが得られる頻度、およびそのサイトカインパターンに明らかな差は認められなかった。また、ラインを作成する際の初期刺激として α GC を用いるか OCH を用いるかで、HS、MS とともにその頻度に差は認められなかった。なお、IFN β もしくはステロイド治療中の MS において IL-2 添加にて IL-5 を産生するラインが得られる確率が高い傾向を認めた。また、CD4 陰性 NKT 細胞ラインには、このような著明な IL-5 を産生するものは認められなかった。

IL-2 による IL-5 の誘導は、抗 IL-2 受容体 α 鎖 (CD25) に対するブロッキング抗体を用いることで完全に抑制された。IL-2 以外にも、IL-2 受容体 β 鎖を共有する受容体をもつ、IL-15 の添加では同様の IL-5 の産生が認められるも、IL-2 受容体の γ 鎖を共有する IL-4, IL-7, IL-9 では認められなかった。IL-2 によって IL-5 が産生される NKT 細胞が IL-2 添加時にどのよう

な遺伝子発現が誘導されるか、このような NKT 細胞ラインを 4 つ用いてマイクロアレイ解析にて検討した。有意に発現の上昇が認められた遺伝子のうち、もっとも発現増加が認められたものは IL-5 遺伝子であったが、IL-13 遺伝子の増加も高くなっており、このため上清中の IL-13 を測定したが、やはり大量に産生されていることが確認された。なお、他のサイトカイン遺伝子の有意な発現増加は認められなかった。

次に IL-2 による IL-5 の産生誘導の機序において、TCR-CD1d の認識の重要性を検討した。APC 非存在下では IL-2 を添加しても IL-5 の著明な産生は認められなかった。また、IL-5 の産生は CD1d-transfected Hela 細胞を APC として用いた場合のみに認められ、mock-transfected Hela 細胞を APC とした際には認められなかった。さらに近年内因性抗原の候補として報告された isoglobotrihexosylceramide iGb3 の関与についても検討したが、iGb3 を投与しても、同様の IL-5 産生パターンは認められなかった。さらに iGb3 の作用を阻害することが報告されている isolectin B4 を用いても IL-2 による IL-5 の産生は抑制されなかった。また、抗 CD3 モノクローナル抗体にて T cell receptor (TCR) 刺激をおこない、IL-2 を介した NKT 細胞による IL-5 の産生増加の効果が再現できないか確認した。抗 CD3 抗体単独刺激ではほとんどサイトカイン産生をもたらさないいわば suboptimal dose ともいえる非常に低濃度刺激にて IL-2 による IL-5 の選択的産生増強効果が認められたが、興味深いことに、より高濃度のいわば optimal dose の刺激では、この効果は消失し、IFN γ 優位の反応が見られた。

これが、fresh な NKT 細胞でも検討するため、BALB/c マウスの肝臓および脾臓より α GC loaded CD1d-Dimer X を用いて NKT 細胞を cell sorting にて分離し、この新鮮な NKT 細胞を用いて、脾臓から分離した CD11c 陽性細胞を APC として in vitro で同様の実験をおこなった。抗原を加えることなく、IL-2 添加のみで同様な IL-5 の産生誘導が確認された。

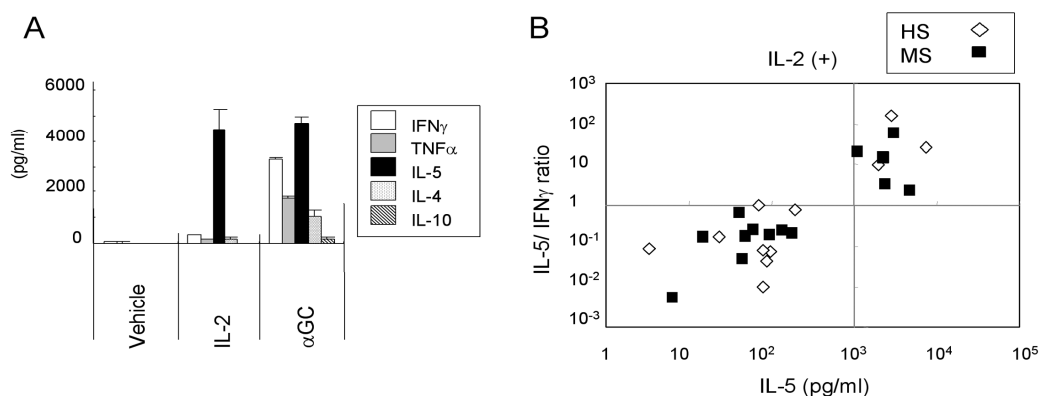


図 ヒト CD4 陽性 NKT 細胞ラインに IL-2 にて著明な IL-5 の産生が誘導される一群が存在する
 A IL-5 を産生する CD4 陽性 NKT 細胞ラインと樹状細胞の共培養時の上清中の代表的なサイトカインプロファイル。
 B 作成したすべてのラインにおける IL-2 添加時の IL-5 産生量と IL-5/IFN γ 産生比。

なお、IL-5がT細胞性免疫に対して果たす役割については明確なdataが存在しないため、IL-2によって誘導されたIL-5がnaïve CD4 helper T細胞に作用するか検討した。IL-5産生性のNKT細胞とDCを2日間培養し、その上清を取り出して、抗CD3モノクローナル抗体による刺激のもとnaïve CD4 helper T細胞を上清中で分化させた。分化したT細胞のIFN γ およびIL-4のintracellular stainingをおこなった。分化させる際にIL-5の中和抗体を投与したものは、投与しないものよりも有意にIL-4陽性T細胞の割合が減少しており、IL-5がTh2細胞への分化に促進的に関与する可能性が示された。

<考察>

IL-2を介して、IL-5とIL-13を主としたTh2偏倚のサイトカイン産生を呈するCD4陽性NKT細胞の一群が存在することが示された。IL-5の産生はNKT細胞に対するIL-2刺激だけではほとんど認められず、T細胞受容体(TCR)-CD1d間の認識、すなわちおそらくiGb3以外の何らかの内因性抗原を介したNKT細胞のsuboptimal stimulationが必要であることが明らかになった。また、この反応はIL-2受容体の β 鎖を介したシグナルを必要とすることが判明した。また、同様の反応がBALB/c由来のfresh NKT細胞で認められたことから、ラインに限られた反応ではないと言える。

炎症など、IL-2の過剰な産生が引き起こされる状況の下では、内因性抗原を認識しているCD4陽性NKT細胞はIL-5などTh2サイトカインを優位に産生し、Th2偏倚を誘導する機序の一端を担い得ると考えられる。また、EAEなどTh1偏倚がその病態に深く関わっていると考えられる自己免疫疾患において、Th1偏倚を是正する調節細胞として働く可能性ことが初めて示唆されたといえる。多発性硬化症の治療標的として有用な細胞と期待される。