

審査の結果の要旨

氏名 作石 かおり

本研究は多発性硬化症など自己免疫疾患に調節性に働きうるヒト invariant NKT (iNKT) 細胞においてその多様な機能がどの様に制御されているかを明らかにするため、健常者および寛解期の多発性硬化症患者の末梢血からヒト CD4 陽性 iNKT 細胞のラインを作成し、そのサイトカイン産生能について解析を試みたものであり、下記の結果を得た。

1. iNKT 細胞と CD1d 分子陽性細胞の共培養において IL-2 存在下で、上清中のサイトカインを cytometric beads array にて調べたところ、IL-5 を選択的に大量に産生する細胞の一群を見出した。 α -galactosylceramide や抗 CD3 モノクローナル抗体 (抗 CD3 抗体) のような外因性刺激とは異なり IFN γ や IL-4 の産生を伴わず、しかし IL-5 産生量はこれに匹敵するほどのものであった。IL-5 の選択的産生は microarray 法を用いた遺伝子発現解析でも確認され、さらに IL-13 も産生されていることが明らかになった。一方、CD4 陰性 NKT 細胞のラインではこのような IL-5/IL-13 の産生は認められなかった。なお、健常者でも、多発性硬化症患者でも同様の頻度でこのような細胞は得られたが、多発性硬化症患者のなかではとくにステロイドや interferon- β にて治療中の者に多い傾向が認められた。
2. IL-2 以外のサイトカインで同様の IL-5 の選択的産生が見られるか検討した。IL-2 受容体の common γ chain を共有する、IL-4, IL-7, IL-9 では認められず、IL-2 受容体の β chain をも共有する IL-15 において認められ、IL-2 受容体の β 鎖を介した刺激が必要であると考えられた。
3. Immature DC や CD1d transfected Hela 細胞など CD1d 陽性細胞非存在下では、IL-2 を添加しても iNKT 細胞による IL-5 の産生は認められず、IL-2 受容体を介したシグナル伝達だけでなく、T 細胞レセプター (TCR) による CD1d 分子の認識が必要であることが明らかになった。なお、immature DC と mature DC の IL-5 産生誘導能を比較したところ、DC の成熟度に関わらず IL-5 の産生を認め、IL-5 の産生は co-stimulatory molecule を介したシグナルに依存しないことが明らかになった。

4. 同様の IL-2 による IL-5 の選択的産生増強効果は、抗 CD3 抗体によって α NKT 細胞を TCR 刺激した際にも認められた。ただし、それ単独刺激ではサイトカイン産生をもたらさないほどの微量の抗 CD3 抗体を用いたときのみ IL-5 の選択的産生が認められ、抗 CD3 抗体の濃度を増やすと IL-5 の選択性はむしろ消失した。このことから IL-5 の選択的産生には、おそらく内因性抗原を結合した CD1d 分子による TCR 刺激を介して α NKT 細胞が潜在的に活性化されていることが必要であると考えられた。しかし、近年内因性抗原の候補の一つであると報告された isoglobosyltrihexosylceramide (iGb3) による刺激では IL-5 は誘導されず、iGb3 の作用を阻害することが示された isolectin B4 でも、IL-5 の産生は抑制されず、iGb3 以外の内因性抗原が関与していると考えられた。
5. IL-2 による IL-5 の選択的産生が生体内でも起こりうるか検討するため、新鮮血における α NKT 細胞で IL-5 の産生を確認しようと試みたが、末梢血中の α NKT 細胞の頻度が低く分離困難で、また IL-5 の intracellular cytokine assay の感度の問題からマウスの α NKT 細胞を用いて同様の in vitro の実験をおこなった。BALB/c マウスの肝臓および脾臓より分離した α NKT 細胞を用いたところ IL-2 による IL-5 の選択的産生増強効果が認められラインに限った現象でないことが明らかにされた。
6. IL-2 によって誘導された IL-5 の産生が CD4 陽性 T 細胞に与える効果を検討する目的で、 α NKT 細胞と iDC 細胞の共培養の上清を回収し、この上清下で抗 CD3 抗体刺激による naïve CD4 陽性 T 細胞の分化培養を行い、IFN γ および IL-4 の intracellular assay にて α NKT/iDC 培養上清が分化誘導に与える影響を確認した。IL-2 を添加した培養上清を用いた際に、IL-2 非添加のものを用いた場合よりも多くの IL-4 産生性 T 細胞が得られ、この効果は抗 IL-5 中和抗体によって消失し、IL-2 によって産生誘導された IL-5 が Th2 細胞の分化誘導を促進する可能性が示された。

以上、本学位申請者は、ヒト CD4 陽性 α NKT 細胞のうち IL-2 を介して IL-5/IL-13 など Th2 サイトカインを産生する一群が存在することを初めて明らかにした。さらに、IL-5 の産生には IL-2 受容体の刺激加えて、内因性抗原-CD1d 分子複合体の認識を介した TCR の刺激によって α NKT 細胞が潜在的に活性化されることが必要であることが明らかになった。生体内での α NKT 細胞の機能制御機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値すると考えられる。