



|                     |                                                                                                                           |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 自己血管内皮細胞反応性type II NKT細胞が認識する分子の同定および同細胞の血管炎病態への関与 [論文内容及び審査の要旨]                                                          |
| Author(s)           | 西岡, 佑介                                                                                                                    |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                     |
| Degree Name         | 博士(保健科学)                                                                                                                  |
| Dissertation Number | 甲第12753号                                                                                                                  |
| Issue Date          | 2017-03-23                                                                                                                |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/65368">https://hdl.handle.net/2115/65368</a>                                         |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                           |
| File Information    | Yusuke_Nishioka_abstract.pdf, 論文内容の要旨                                                                                     |



## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（保健科学）

氏名：西 岡 佑 介

### 学位論文題名

自己血管内皮細胞反応性 type II NKT 細胞の認識する分子の同定および同細胞の血管炎病態への関与

Natural killer T (NKT) 細胞は、major histocompatibility complex (MHC) class I 様抗原提示分子に拘束される T 細胞として定義され、type I NKT 細胞と type II NKT 細胞に大別される。Type I NKT 細胞は invariant な T cell receptor (TCR) (齧歯類では V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18、ヒトでは V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18) を使用し、海綿由来の糖脂質抗原である alpha-galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) を認識する。一方、type II NKT 細胞は多彩な TCR を用いており、認識抗原も多様であると考えられているものの、検出方法が未だ確立されておらず、その抗原レパートリーの詳細は謎に包まれている。また、NKT 細胞は全リンパ球に占める割合こそ非常に小さいものの多種多様なサイトカインを迅速・大量に産生し、種々の免疫応答の調節に関与している。一般に、炎症条件下において type I NKT 細胞は炎症反応を促進する「免疫促進的」なサブセットであると形容される。一方で、type II NKT 細胞は「免疫抑制的」に炎症反応の沈静に作用する。Type II NKT 細胞が機能異常をきたすと過剰な炎症が誘導され、自己免疫疾患につながる可能性が指摘されている。本博士論文では、NKT 細胞について概説し、さらに血管炎モデルラットを用いた type II NKT 細胞の認識抗原の同定について述べる。また、ラットモデルで同定した抗原を用いたヒト末梢血からの type II NKT 細胞検出方法の確立、ならびに同法により明らかにした血管炎患者における type II NKT 細胞の機能異常について述べる。

本研究室では過去に血管炎を自然発症する血管炎モデルラットを作製し、リンパ節細胞から血管内細胞に反応して活性化する T 細胞クローン VASC-1 を単離した。VASC-1 は CD1d 拘束性を示し、 $\alpha$ -GalCer 非反応性であったことから type II NKT 細胞であると考えられた。さらに先行研究では、サルとラットの CD1d のアミノ酸配列の相同性に着目し、サル腎臓由来細胞株である COS-7 にラット遺伝子を導入し、これを抗原提示細胞として VASC-1 の認識抗原スクリーニングを行った。結果、ラット sterol carrier protein 2 (SCP2) が挿入された COS-7 と VASC-1 は接着・活性化したため、これが抗原である可能性が遺伝子レベルで示された。そこで本研究では、VASC-1 が真に SCP2 を認識することをタンパク質レベルで確認した。第一に、培養ラット血管内皮細胞 (REC) の SCP2 発現が VASC-1 の接着にどのような影響を及ぼすかを、siRNA を用いて調べた。すると、REC の SCP2 mRNA をノックダウンすることにより、VASC-1 との共培養時に接着性が有意に低下した。次に、COS-7 に挿入されていた SCP2 遺伝子断片から 9 種類のラット SCP2 ペプチドを合成し、これらを COS-7 細胞内に導入した。VASC-1 と共培養し、接着性を評価したところ、rSCP2<sub>518-532</sub> 導入 COS-7 に対し最も良好な接着性を示したため、これがエピトープである可能性が示唆された。真に rSCP2<sub>518-532</sub> が VASC-1 のエピトープであることを確認する目的で、REC の SCP2 をノックダウンした後、同ペプチドを導入、VASC-1 と共培養した。共培養後の VASC-1 の増殖活性を調べると、SCP2 発現低下に伴い VASC-1 の増殖活性も低下したが、rSCP2<sub>518-532</sub> 導入 REC ではその低下

が回復したため、rSCP2<sub>518-532</sub>は VASC-1 の認識エピトープであり、VASC-1 の活性化に関与していることが示唆された。さらに発症前の血管炎モデルラットに rSCP2<sub>518-532</sub> を免疫すると血管炎発症が促進されたため、本ラットの血管炎発症には rSCP2<sub>518-532</sub> 反応性 type II NKT 細胞が関与していることが明らかとなった。

動物モデルで得られた結果を踏まえ、rSCP2<sub>518-532</sub> のヒトホモログである hSCP2<sub>518-532</sub> を合成した。初めに、ヒト CD1d に hSCP2<sub>518-532</sub> が真に結合するか否かを調べた。ビオチン化した hSCP2<sub>518-532</sub> をヒト CD1d、 $\alpha$ -GalCer と反応させ、吸光度を調べた。すると、hSCP2<sub>518-532</sub> の CD1d への結合は  $\alpha$ -GalCer により競合阻害を受けたため、hSCP2<sub>518-532</sub> は CD1d の抗原提示部位に結合することが証明された。次に hSCP2<sub>518-532</sub> を CD1d テトラマーと結合し、これを末梢血単核球と反応させ、フローサイトメーターでの検出を試みた。健常者と血管炎患者の双方で hSCP2<sub>518-532</sub>/CD1d テトラマー陽性となる細胞集団の検出に成功した。興味深いことに、hSCP2<sub>518-532</sub> 反応性 type II NKT 細胞の検出頻度は血管炎患者で増加していた。この結果を受け、末梢血単核球を抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激し、同細胞集団の細胞内サイトカインについて調べた。炎症性サイトカインの代表例として tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) を、抗炎症性サイトカインの代表例として transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) を染色し、フローサイトメーターで解析した。その結果、健常者の hSCP2<sub>518-532</sub> 反応性 type II NKT 細胞は TGF- $\beta$  産生優位な細胞集団であったが、血管炎患者の hSCP2<sub>518-532</sub> 反応性 type II NKT 細胞では TGF- $\beta$  産生が減弱化していた。以上の結果は、血管炎患者における hSCP2<sub>518-532</sub> 反応性 type II NKT 細胞のサイトカイン産生異常、あるいは生体内における NKT 細胞の疲弊を反映していると考えられる。今後同一患者の血管炎初発時、治療後、再燃時の hSCP2<sub>518-532</sub> 反応性 type II NKT 細胞のサイトカイン産生を調べることによって、type II NKT 細胞の異常が、血管炎発症の原因となっているのか、あるいは結果なのかを明らかにする必要がある。