



HOKKAIDO UNIVERSITY

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 [全文の要約]
Author(s)	西岡, 佑介
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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	https://hdl.handle.net/2115/65373
Type	doctoral thesis
File Information	Yusuke_Nishioka_summary.pdf



学位論文内容の要約

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

1. 緒言

Natural killer T (NKT) 細胞は、major histocompatibility complex (MHC) class I 様抗原提示分子である CD1d 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 Va14-Ja18、ヒトでは Va24-Ja18) を使用し、海綿由来の糖脂質抗原である alpha-galactosylceramide (α -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、自己免疫疾患のひとつである血管炎を自然発症する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。

2. 血管炎誘発性 type II NKT 細胞が認識する抗原の同定

血管炎は血管自体が炎症性に障害される疾患である。侵される血管の大きさによって、主に細動脈や毛細血管に病変をきたす小型血管炎、内臓器に向かう主要動脈に発症する中型血管炎、そして大動脈とその主要分岐に発症する大型血管炎に分類できる。小型血管炎の発症機序としては、(1) 免疫複合体の沈着が関与するもの、(2) 抗好中球細胞質抗体(ANCA)が関与するもの、(3) 未知のメカニズムによるものがある。これまで、液性免疫異常を基にして発症する血管炎についてはよく研究されてきたが、自己抗体の関与が明らかでない血管炎も少なからず存在する。しかしながら、こうした血管炎を解析するための適切なモデル動物は限られており、研究は必ずしも進んでいないのが実情である。

本研究室では、小型血管炎を自然発症するトランスジェニックラットである env-pX ラットを系統維持している。同ラットの血清中に ANCA は陰性である。活性化刺激に対して過剰反応を示す末梢血 T 細胞の存在や、env-pX ラットの胸腺フレームワークを野生型ラットに移植すると小型血管炎が誘導されること、異常な制御性 T 細胞 (Treg) の存在は、本ラットに発症する小型血管炎が細胞性免疫の異常によることを示唆している。この仮説を証明する目的で、先行研究では、env-pX ラットのリンパ節より、血管内皮細胞反応性に増殖・活性化する血管炎惹起性 T 細胞クローン VASC-1 を単離した。フェノタイプ解析において VASC-1 は CD1d 拘束性を示したため NKT 細胞クローンであると考えられた。さらに type I NKT 細胞が認識する抗原である α -GalCer に対し非反応性であったため、VASC-1 は type II NKT 細胞であると考えられた。しかしながら VASC-1 の認識抗原は未同定であった。

NKT 細胞への抗原提示分子である CD1d は動物種間でよく保存されている分子である。特にサルとラットの CD1d は、抗原提示に重要なアミノ酸が一致しており、適切なラット抗原を提示したサル CD1d はラット NKT 細胞である VASC-1 を活性化できると考えられる。先行研究では、VASC-1 の認識抗原のスクリーニングを目的として、サル腎臓由来細胞株である COS-7 にラット肺 cDNA ライブラリを導入し、VASC-1 との共培養系を構築している。その結果、VASC-1 は SCP2 をコードする遺伝子断片が導入された COS-7 トランスフェクタントとのみ接着・活性化した。しかしながら、VASC-1 が抗原として SCP2 を認識しているか否かはこの段階では確定的ではなかった。そこで本研究では、VASC-1 が真に SCP2 を認識することを以下の実験によりタンパク質レベルで解析するとともに、

そのエピトープを同定した。

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、rSCP2₅₁₈₋₅₃₂ 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 rSCP2₅₁₈₋₅₃₂ 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、rSCP2₅₁₈₋₅₃₂ 導入 REC ではその低下が回復したため、rSCP2₅₁₈₋₅₃₂ 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 rSCP2₅₁₈₋₅₃₂ 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 rSCP2₅₁₈₋₅₃₂ 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。

3. ヒト末梢血中の *SCP2* 反応性 type II NKT 細胞の検出

動物モデルで得られた結果を踏まえ、rSCP2₅₁₈₋₅₃₂ のヒトホモログである hSCP2₅₁₈₋₅₃₂ を合成した。初めに、ヒト CD1d に hSCP2₅₁₈₋₅₃₂ が真に結合するか否かを調べた。ビオチン化した hSCP2₅₁₈₋₅₃₂ をヒト CD1d、 α -GalCer と反応させ、吸光度を調べた。すると、hSCP2₅₁₈₋₅₃₂ の CD1d への結合は α -GalCer により競合阻害を受けたため、hSCP2₅₁₈₋₅₃₂ は CD1d の抗原提示部位に結合することが証明された。次に hSCP2₅₁₈₋₅₃₂ 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 hSCP2₅₁₈₋₅₃₂/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、hSCP2₅₁₈₋₅₃₂ 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- α (TNF- α) を、抗炎症性サイトカインの代表例として transforming growth factor- β (TGF- β) 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 hSCP2₅₁₈₋₅₃₂ 反応性 type II NKT 細胞は TGF- β 産生優位な細胞集団であったが、血管炎患者の hSCP2₅₁₈₋₅₃₂ 反応性 type II NKT 細胞では TGF- β 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 hSCP2₅₁₈₋₅₃₂ 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た。

4. 今後の展望

自己免疫疾患は、自身の組織に対し免疫系が過剰な攻撃を加えることにより発症するとされている。血管炎についても、ANCA をはじめとする自己抗体の病態への関与が示唆されている。しかしながら自己抗体の関与しない、すなわち T 細胞やマクロファージが自己血管を直接障害する細胞性免疫異常によって発症する血管炎も存在する。本博士論文では、本来は「免疫抑制的」な自己反応性 type II NKT 細胞の機能異常が血管炎を誘導する新たな発症機序について、得られた研究成果を踏まえて論じてきた。しかしながら、(1) VASC-1 がなぜ小型血管のみを標的とするのか、(2) ヒトにおけるサイトカイン産生異常は血管炎の「原因」なのか「結果」なのか、そして「原因」ならばどのような転写因子・タンパク質が SCP2 反応性 type II NKT 細胞の異常を規定しているのか、については調査が不十分であり、より詳細な解析が求められる。今後は、ラットモデルでは VASC-1 の小型血管へのホーミングを担う分子の同定を進める。ヒトにおいては、同一患者の追跡調査の実施、CAGE やエピゲノム解析などの網羅的遺伝子解析を行い、自己反応性 type II NKT 細胞の機能異常の原因を追究する予定である。そしてそれらの研究成果は、血管炎病態のより深い理解に貢献できると考えている。