

樹状細胞による NKT 細胞の サイトカイン産生制御と腫瘍拒絶効果

学位論文内容の要旨

緒言

Natural killer T 細胞 (以下 NKT 細胞)は、抗原提示細胞 (以下 APC : antigen-presenting cell)上の CD1d 分子に特異的に結合する海綿由来の糖脂質, α -galactosylceramide (以下 α -GalCer), を認識する. α -GalCer を介した CD1d 分子との結合により, NKT 細胞は活性化し T helper type 1 (以下 Th1) サイトカインである interferon- γ (以下 IFN- γ)と Th2 サイトカインである interleukin-4 (以下 IL-4)を大量に産生する. NKT 細胞が産生する IFN- γ によって, NK 細胞や CD8 陽性 T 細胞の細胞障害作用の活性化といった Th1 タイプの免疫反応が誘導され, 病原体や腫瘍細胞を排除する. 一方, IL-4 によって自己に対する Th1 型免疫反応は抑制される. このように NKT 細胞は相反する作用を有している. 従って, NKT 細胞からの IFN- γ と IL-4 の産生がどのように制御されているかを解明する事は重要である.

樹状細胞 (以下 DCs : dendritic cells)は強力な APC で DCs が中心となり様々な抗原に対する免疫反応を誘導・制御する. DCs はまた, CD1d 分子を介して NKT 細胞を最も効率的に活性化させる事ができる細胞と考えられている. 本研究の目的はこの DCs の APC 機能を修飾し, NKT 細胞刺激後の IFN- γ /IL-4 産生を制御する戦略を開発することである. この NKT 細胞の相反するサイトカイン産生機能を制御できれば, 抗癌免疫療法など目的に応じた臨床治療への応用が考えられる. この研究ではマウスにおいて Th1/Th2 サイトカインが DCs を介する NKT 細胞刺激にどのような影響を及ぼすか検討し, DCs が最初に接触するサイトカイン型によって, NKT 細胞の産生するサイトカインが制御されるネガティブフィードバック機構を発見したので報告する.

材料及び方法

実験 1 Th1/Th2 サイトカインが DCs の NKT 細胞刺激に与える影響

1) *in vitro*

BALB/c マウス脾細胞を 2 週間培養し得られた DCs に α -GalCer をパルスし IL-4 存在下 (IL-4/DCs)もしくは IFN- γ 存在下 (IFN/DCs), もしくはサイトカインの添加なし (iDCs) で 72 時間培養した. これらの DCs を脾細胞と 48 時間共培養し, 刺激された NKT 細胞から上清中に産生される IFN- γ /IL-4 を ELISA 法にて測定した.

2) *in vivo*

同様の処理で得られた α -GalCer をパルスした iDCs, IL-4/DCs, IFN/DCs をマウス脾臓内へ直接注射 (脾注)した. 刺激を受けた NKT 細胞から血清中へ産生される IFN- γ /IL-4 を ELISA 法にて測定した.

実験 2 IL-4 投与が DCs/NKT 細胞相互作用に与える影響

1) *in vitro*

未処理のマウスまたは IL-4 投与マウスの脾臓を採取し, それぞれの脾細胞を α -GalCer と培

養し NKT 細胞から上清中に産生される IFN- γ /IL-4 を ELISA 法にて測定した。ついで未処理マウスまたは IL-4 投与マウス脾細胞から DCs のみを抽出し、DCs を除去した脾細胞と α -GalCer 存在下で培養後、上清中の IFN- γ /IL-4 を測定した。

2) *in vivo*

未処理マウス・IL-4 投与マウスに α -GalCer を静脈内注射 (静注)し血清中の IFN- γ /IL-4 を測定した。

3) 腫瘍細胞傷害試験

未処理のマウス・IL-4 投与マウスに α -GalCer を静注し 24 時間後に脾臓を摘出。それぞれの脾細胞の腫瘍細胞株に対するキラー活性を 4 時間 ^{51}Cr 遊離細胞傷害試験にて測定した。

4) 腫瘍転移抑制効果

未処理のマウス・IL-4 投与マウスに α -GalCer とマウス腎癌細胞とを静注し 3 週後の肺転移数を比較した。

結果

実験 1-1) *in vitro* で未処理の DCs (iDCs) に比べ IL-4 で処理した DCs (IL-4/DCs) は NKT 細胞からの IFN- γ 産生を強く誘導し一方、IFN- γ で処理した DCs (IFN/DCs) は、NKT 細胞からの IL-4 産生を強く誘導した。

実験 1-2) *in vivo* においても IL-4/DCs を脾注されたマウスでは iDCs を投与されたマウスに比べ血清中の IFN- γ 濃度が有意に増加した。一方、IFN- γ /DCs を脾注されたマウスでは血清中の IL-4 濃度が有意に増加した。

実験 2-1) IL-4 投与マウスの脾細胞に α -GalCer を添加した培養系では未処理マウスに比し有意に NKT 細胞からの IFN- γ 産生が上昇していた。次いで、IL-4 投与マウス由来の DCs は未処理マウス由来の DCs よりも NKT 細胞から強く IFN- γ 産生を誘導した。

実験 2-2) 未処理マウスと IL-4 投与マウスに α -GalCer を静注した場合、IL-4 投与マウスでは未処理マウスに比し有意に血清 IFN- γ 産生が上昇していた。血清 IL-4 値は両者間に差はなかった。

実験 2-3) 未処理マウスと IL-4 投与マウスに α -GalCer を静注し 24 時間後に採取した脾細胞は腫瘍細胞株に対するキラー活性が α -GalCer 単独投与マウスに比べ有意に増強していた。

実験 2-4) マウス腎癌肺転移モデルでは α -GalCer を静注された IL-4 未処理マウスでは肺転移は完全に抑制されなかったが、IL-4 投与マウスに α -GalCer を静注した群においては肺転移がほとんど完全に抑制されていた。

結論

実験 1 では、*in vitro* と *in vivo* において Th1 サイトカインである IFN- γ で DC を処理し NKT 細胞を刺激すると、Th2 サイトカインである IL-4 の産生が増強される事が示された。反対に IL-4 で DC を処理し NKT 細胞を刺激すると、IFN- γ の産生が増強された。これらの結果から、Th1/Th2 サイトカインの影響を受けた DCs が NKT 細胞からの Th1/Th2 サイトカイン産生をネガティブフィードバック機構によって調節していると考えられる。そこで実験 2 では IL-4 を実際にマウスに投与し、その脾細胞から精製した DCs と α -GalCer で NKT 細胞を刺激した。*in vivo* で IL-4 処理した DCs が NKT 細胞を刺激すると IFN- γ の産生が増強された。また IL-4 投与マウスに α -GalCer を投与した場合も NKT 細胞からの IFN- γ の産生が増加した。また IFN- γ 産生増強に伴うキラー活性・転移抑制効果も増強した。以上の結果から DCs が NKT 細胞を刺激し NKT 細胞からサイトカイン産生されるという一連の相互作用において DCs を介したネガティブフィードバック機構が存在する事を *in vitro* と *in vivo* において示した。このネガティブフィードバック調節は Th1/Th2 への反応が過剰にならないように働くと考えられた。

今後、この性質を用いた DCs/NKT 細胞による抗癌免疫療法への応用の可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野々村 克 也
副 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 小野江 和 則

学 位 論 文 題 名

樹状細胞による NKT 細胞の サイトカイン産生制御と腫瘍拒絶効果

現在、癌免疫治療に樹状細胞(以下 DC)を用いる方法が主流となっている。臨床応用もされつつあるが、その治療成績は必ずしも良好とは云えない。最近、IFN- γ を大量に産生するNKT細胞が抗腫瘍作用を持つ細胞集団として注目されている。本研究では、DCによって刺激されるNKT細胞からのサイトカイン産生を制御することにより、癌免疫治療へ応用することを目的とした。その結果、NKT細胞からのサイトカイン産生において、DCを介したネガティブフィードバック制御が存在することを示し、この機構を用いて腫瘍拒絶を試みた。すなわちIL-4により処理されたDCによる α -GalCer提示は、NKT細胞からのIFN- γ 産生を促進し、反対にIFN- γ で処理されたDCはNKT細胞によるIL-4の産生を促進することを*in vitro*と*in vivo*において示した。更にこのネガティブフィードバック機構を応用し、マウスへIL-4と α -GalCerを投与することにより、腫瘍細胞に対するキラー活性、抗転移効果を増強することに成功した。質疑応答では、副査の秋田弘俊教授から、NKT細胞の表面マーカー、シグナル伝達の違いに関し質問があった。申請者はNKT細胞内の転写因子*c-Rel*の発現増加があるとIFN- γ 産生が増強されるとの報告があり、本実験系における*c-Rel*の発現増強の有無を検討していく予定と回答した。またIL-4以外にDCで刺激した際にNKT細胞からのサイトカイン産生がTh1優位となるサイトカインや物質が存在しないかについても質問があった。申請者はIL-12存在下でのDCとNKT細胞との相互作用の際にNKT細胞からのサイトカイン産生はTh1優位となる報告があること、またTh1サイトカイン産生有意となるような α -GalCer類似の糖脂質の開発が現在行われていると回答した。更に、実際に臨床応用への可能性についても質問があった。肺癌術後に再発抑制の目的に既に投与している施設があること、また海外にて腎細胞癌症例において α -GalCer投与により腫瘍の中心壊死を認めた報告があると回答した。次いで、副査の

小野江和則教授から、免疫反応は最終的には収束機構であり、今回のネガティブフィードバック機構は道理にかなったメカニズムではあるが、はたしてそのメカニズムはいかなるものかについて質問があった。申請者は本研究ではそれぞれの DC について表面マーカーの差異しか検討していないが、IL-4 処理した DC では CD1d 分子の発現が減弱することにより TCR からのシグナルよりも相対的に CD 40 / CD40L からのシグナルが増強し IFN- γ の産生増強があるのではないかと回答した。また、 α -GalCer 類似の物質で哺乳類や生体内で相当する物質が同定されているのか質問があった。これに対して昨年 isoglobotrihexosylceramide (iGb3) が内在性のリガンドの一つであることが報告されたと回答した。フロアの畠山教授からは TCR から NKT 細胞へのシグナルの入力の強弱によって IFN- γ 産生に差が生じるか質問があった。TCR から NKT 細胞へ持続的なシグナルの入力があると NKT 細胞内の NF-AT の核内存在時間が延長し、IFN- γ 産生が増強し、一方、断続的なシグナルの入力があると NKT 細胞内の NF-AT の核内存在時間が短縮し、IFN- γ 産生が減弱するとの報告があり、本実験系でも IL-4 処理した DC では NF-AT の核内存在時間が延長していることが予想されると回答した。また、実験方法として *in vitro* で直接 NKT 細胞のみを刺激する方法はないのか、またその際にサイトカイン産生はどのようになるのか質問があった、抗 CD3 抗体の添加、もしくは培養 well に DX5 をコーティングしておくことにより NKT 細胞を刺激することが可能であること、そしてその際に産生されるサイトカインは IFN- γ と IL-4 であると回答した、最後に主査の野々村克也教授より、現在のところ DC を用いた癌免疫療法の治療成績は低いですが、本実験の免疫治療法が既に転移のある症例へ臨床応用できるものか質問があった。申請者は本実験系と同様に IL-4 前投与後に α -GalCer を投与することにより、強い IFN- γ 産生が起こることを利用する方法や、腫瘍抗原との同時投与により腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞を誘導する方法が考えられると回答した。

この論文は、新たな免疫系制御機構を発見したものとして高く評価され、今後の発展により新たな癌免疫治療法の確立が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。