

## 平成20年度 研究戦略プロジェクト事業 研究成果報告書

平成21年6月30日

公立大学法人横浜市立大学  
理事長 様

平成20年度 研究戦略プロジェクト事業 (W20017) で行った研究成果等は下記のとおりです。

記

<b>1 研究者情報</b>	研究代表者氏名 (所属・職位)	堀田 千絵 (医学部免疫学教室・助教)			
<b>2 事業情報</b>	新規・継続の分け				
	研究費の区分	若手人材育成推進費 (自然科学)			
	研究課題名	新規抑制制NK T細胞の免疫抑制機序解明			
	研究実施期間	平成20年7月1日 ~ 平成21年3月31日			
	研究ユニットの構成 <small>※研究代表者も含む ※研究計画書と相違のないようにご注意ください。</small>	所属名・企業名等	役職名	氏名	役割
	横浜市立大学 医学部免疫学 教室	助教	堀田千絵	実験企画担当	
<b>3 研究概要</b>	<p>我々は、ヒト末梢血から抑制性樹状細胞を分化誘導し、この免疫抑制機能について解析している。ヒト抑制性樹状細胞は、<i>in vitro</i>で <math>\alpha</math>-galactosylceramide (<math>\alpha</math>-GalCer) 糖脂質抗原提示刺激を介して免疫抑制能を持つNKT細胞を分化誘導することを見出した。我々はこの新規NKTサブセットを制御性NKT細胞と名付け、機能解析を行っている。ヒト抑制性NKT細胞の注目すべき特性として、抑制性サイトカイン (IL-10) を過分泌し、細胞増殖応答や細胞傷害活性を示さず、炎症性T細胞の抗原特異的な増殖応答を抑制し、未成熟樹状細胞の成熟・活性化を阻害する (<i>Blood</i> 2008. 111(8): 4254-4263)。 <i>in vitro</i>で示されたこれらの免疫抑制効果から、我々が培養誘導した抑制性NKT細胞は、<i>in vivo</i>においても免疫過剰応答に対して免疫寛容を誘導する可能性を期待し、抑制性NKT細胞が自己免疫応答の腑活化を是正することが可能か、慢性的な樹状細胞の活性化や炎症性T細胞の過増殖などを背景とする自己免疫疾患モデルマウスを用いて検討する。さらに、抑制性NKT細胞の免疫抑制効果を詳細に解析し、最終目的としてマウス実験モデルを用いて、新たな免疫細胞ワクチンとして制御性NKT細胞の治療効果を期待し、臨床応用へ発展を検討したい。</p>				

## 4 研究成果

※研究成果については、2,000 字程度で記入して下さい。(絵、図入りも可)

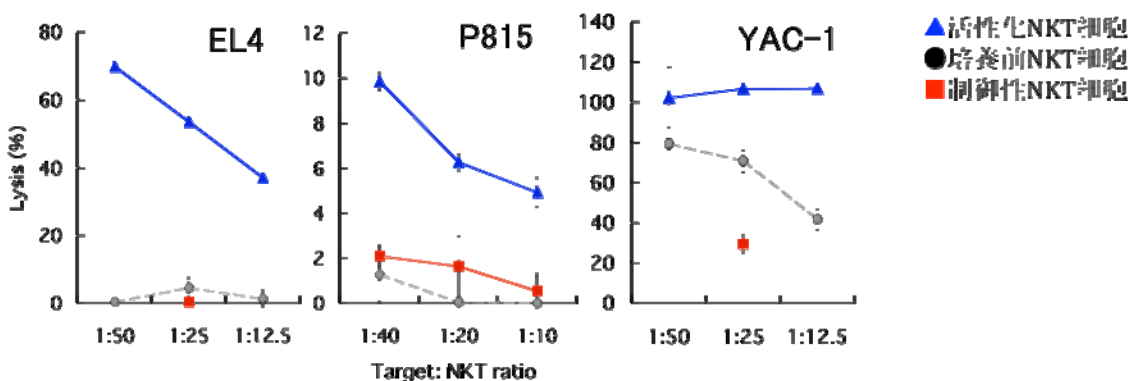
※地域貢献促進費の方は課題提案者に提出する報告書(必須)をご提出頂きますので、この欄は記載しないで結構です。その他の方は別紙を用意せず、この枠の中に記入するようにして下さい。(枚数は問いません)

本研究を開始するにあたり、当研究室で確立したヒト制御性NKT細胞の分化誘導法に準じて、マウス抑制性樹状細胞を抗原提示細胞に用いて、制御性NKT細胞を *in vitro* で分化誘導する培養方法を樹立した。培養に使用したNKT細胞は、マウス脾臓あるいは所属リンパ節由来CD1d<sup>+</sup>NKT細胞であり、抑制性樹状細胞の比較対象として活性化樹状細胞を抗原提示細胞に用いた場合、活性化型NKT細胞が誘導された。このことから、制御性NKT細胞は共培養に用いられる抗原提示細胞の特性、サブセットに依存して、後天的に分化偏向を決定している可能性が示唆された。獲得免疫反応のエフェクター細胞であるT細胞のみならず、免疫防御システムの初動応答、自然免疫に貢献するといわれるNKT細胞においても、終末分化の多様性を示すことが確認されたことは大変興味深く、NKT細胞がより精密な免疫システムによって制御されていることが示された。以後、前述のように抑制性樹状細胞、CD1dリガンドである $\alpha$ -GalCer存在下で、*in vitro* 培養系で分化誘導された抑制性NKT細胞を用いて実験を行った。

### 1) 制御性 NKT 細胞の抑制性特性について

抑制性樹状細胞と $\alpha$ -GalCer 刺激特異的に誘導される制御性 T 細胞の特性を解析した。活性化樹状細胞により誘導される活性化 NKT 細胞は、 $\alpha$ -GalCer の二次刺激により炎症性サイトカインである IFN- $\gamma$  産生が確認されたのに比較して、制御性 NKT 細胞は IFN- $\gamma$  産生が減少し、抑制性 T 細胞が分泌することで知られる抑制性サイトカインのひとつ IL-10 の産生が確認された。NKT 細胞の特色である炎症性サイトカインの分泌が抑制され、かつ IL-10 分泌が確認される独自のサイトカイン分泌様式は、これまで報告がない。また、活性化型 NKT 細胞で顕著に示される NKT 細胞の免疫特性のひとつ、腫瘍細胞の障害活性能力は、制御性 NKT 細胞において著しく低下していた(図1)。

図1 標的腫瘍細胞(EL4, P815, YAC-1)に対する抑制性 NKT 細胞の細胞傷害活性の低下

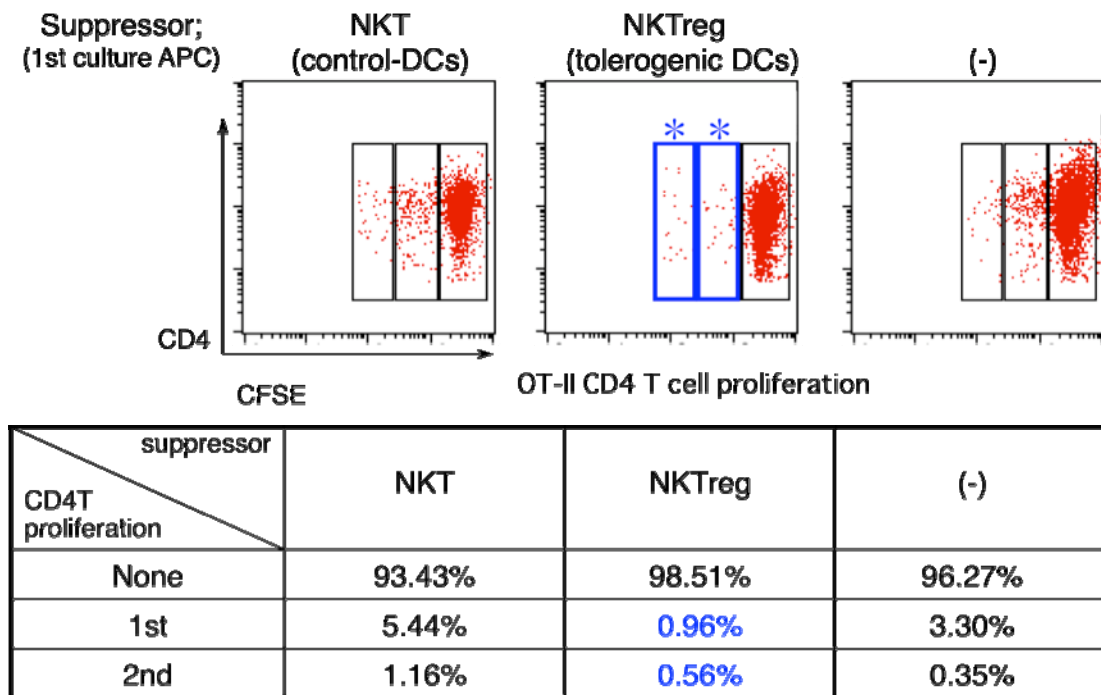


### 2) 制御性 NKT 細胞が誘導する免疫抑制効果について

制御性 NKT 細胞が抗原提示細胞にどのような影響を及ぼしうるか検討した。抗原提示細胞として樹状細胞を選択し、制御性 NKT 細胞と共培養後、樹状細胞の成熟・抗原提示能の変化を検討した。抑制性 NKT 細胞は、樹状細胞の成熟・活性化を阻止することを、CD11c, CD80, CD86, MHC class II などの成熟・活性化マーカーとして知られる機能分子の発現低下から確認した。さらに、制御性 NKT 細胞が獲得免疫のエフェクター細胞である CD4<sup>+</sup>T 細胞/CD8<sup>+</sup>T 細胞の抗原特異的増殖反応に影響するか検討し、制御性 NKT 細胞存在下で OVA 抗原特異的 OT-II CD4<sup>+</sup>T 細胞の細胞分裂が抑制

されることを認めた (図 2)。

図 2 制御性 NKT 細胞 (NKTreg) 存在下で抗原特異的 OT-II CD4<sup>+</sup>T 細胞分裂回数が低下



### 3) 制御性 NKT 細胞の免疫抑制機能の機能因子について

2) で確認された制御性 NKT 細胞の免疫抑制機能について、液性因子・細胞相互作用、それぞれによる抑制機能機構を想定し、第一に液性因子の関与として、1) で確認された 抑制性サイトカイン (IL-10, TGF- $\beta$ ) に着目して抑制機構を調整する作用機序を調べた。図 2 で示したように、抗原特異的な T 細胞増殖低下を認めた制御性 NKT 細胞と OT-II CD4<sup>+</sup>T 細胞の共培養系に、上記サイトカイン中和抗体を用いて、T 細胞増殖低下の効果が阻害されるか検討した。IL-10 中和抗体の添加により T 細胞増殖の抑制は解除されなかったことから、制御性 NKT 細胞が分泌する IL-10 は仮に T 細胞増殖の抑制に関与したとしても、IL-10 と共同で他の代替因子が存在して機能していることを示唆している。第二の可能性として、制御性 NKT 細胞による T 細胞増殖阻害の機構に、標的細胞との細胞間相互作用が必要とされるか、現在確認を行っている。制御性 NKT 細胞が発現する抑制機能分子として、制御性 T 細胞で機能が実証されている CTLA-4, PD-1, Foxp3, TIM 分子を候補に検討しており、各 agonist, antagonist 抗体を作用させて、制御性 NKT 細胞の免疫抑制分子機序を調べている。

### 4) マウス自己免疫疾患モデルへの治療効果の検討について

制御性 NKT 細胞が *in vitro* 培養系で示したと同様に、*in vivo* 免疫応答においても免疫過応答を抑制し免疫寛容を誘導しうるか、また本研究の最終目的として、マウス自己免疫疾患治療の免疫細胞ワクチンとして制御性 NKT 細胞が機能しうるか可能性を検討した。まず疾患モデルとして喘息アレルギーマウスを対象とし、制御性 NKT 細胞の移入により喘息症状が軽減するか観察した。OVA/alum をアジュバントとしてマウスに免疫後、喘息が発症することを確認し、制御性 NKT 細胞を経鼻注射により喘息マウスに移入し、喘息の症状をスコア化して病態の推移を観察した。その結果、症状改善などの顕著な結果は得られなかった。現在、IV 型アレルギーである接触性皮膚炎の抗原誘発遅延型過敏症や骨髄移植後 GVHD などを対象として、同様の実験を続けている。

## 5 研究成果の活用（予定）

例) 平成 22 年度 科学研究費補助金（基盤 S）に申請予定

例) 第〇会 〇〇学会に論文発表予定

例) 研究成果が横浜市〇〇事業に活用され、当該事業の PR イベントが開催された際に広報チラシ等に「横浜市立大学 研究戦略プロジェクト事業」との関連を記載した。

平成 22 年度 科学研究費補助金に申請予定、論文発表予定

※ページ数は増えても構いません。

以上