

Thesis

ヒトV α 24インバリアントNKT細胞サブセットによる 樹状細胞を介した免疫制御機構の解析

埼玉医科大学産婦人科学教室

(指導：石原 理教授)

鈴木 元晴

Analysis of Dendritic Cell-Mediated Immune Regulation by Human V α 24 Invariant NKT Cell Subsets
Motoharu Suzuki (Department of Obstetrics and Gynecology, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

ヒトインバリアントNKT (iNKT)細胞は、非古典的MHC class I分子であるCD1d分子に拘束される従来のTリンパ球とは異なるTリンパ球サブセットである。iNKT細胞の活性化により、自然免疫応答を担当するNK細胞や樹状細胞 (Dendritic cells ; DCs), あるいは獲得免疫応答を担当するB細胞やT細胞など、多くの細胞の迅速な活性化、およびこれらの連鎖反応が誘導される。また、iNKT細胞はTh1, Th2タイプの免疫応答を制御するだけでなく、種々の免疫応答において重要なエフェクター機能を有している。これまでiNKT細胞は、Th2応答を促進し、多くの臓器特異的自己免疫疾患発症の防止に寄与しているとの報告がある。しかし一方でiNKT細胞はTh2免疫応答を抑制し、IL-12によって誘導されるTh1免疫応答を促進し、腫瘍拒絶や感染防御などに関与するとの報告もある。これらの矛盾した現象は、異なる機能を持つiNKT細胞サブセットの存在に起因することが示唆される。実際、iNKT細胞には、CD4⁺, CD8⁺, CD4⁻ CD8⁻ (double negative : DN) サブセットが存在し、それぞれが産生するサイトカインが異なることが知られている。

我々は、DCを介したCD4⁺ T細胞の分化におけるヒトiNKTサブセットの役割を*in vitro*で評価する実験系を構築した。このシステムは、異なるiNKT細胞サブセットと共培養されたmonocyte由来DC (Mo-DCs) とアロのnaive CD4⁺ T細胞を共培養することでhelper分化を評価するものである。これによって、TCRリガンドによって活性化されたCD4⁺, およびDN iNKT細胞サブセットは、DCに対してIL-12p70の産生を促し、完全な成熟を誘導することが明らかとなった。しかし、CD4⁺ iNKTと共培養されて成熟したMo-DCは、naive CD4⁺ T細胞をTh1に分化誘導した (IFN- γ の高産生性とIL-4の低産生性)。一方、DN iNKTと共培養されて成熟したMo-DCは、naive CD4⁺ T細胞をTh2に分化誘導した (IL-4の高産生性とIFN- γ の低産生性)。さらに、CD4⁺ iNKTによって成熟したDCとは対照的に、DN iNKTによって成熟したDCは、stimulator/responder比1 : 30でMLR抑制活性を示した。これらの効果は、iNKT細胞を蛋白合成阻害剤であるemetineで処理することにより消失した。

以上より、ヒトiNKT細胞サブセットのバランスは、T細胞応答の方向性を決定するDCの分化に重要な要素であることが明らかとなった。このメカニズムは、ヒトにおける自己免疫疾患の発症に重要な役割を演じているかもしれない。また、自己免疫疾患治療におけるDN iNKT細胞の有用性を示唆するものである。

緒言

ヒトV α 24インバリアントNKT (iNKT) 細胞は、
医学博士 甲第976号 平成17年3月25日 (埼玉医科大学)

T細胞とナチュラルキラー(NK)細胞の両方の性質を持ち、T細胞抗原受容体(TCR)の他に、NK細胞マーカーであるNKR-P1A (CD161)分子を発現する¹⁾。TCRV α 鎖(V α 24-J α 18)にはTCR遺伝子再構成の際

にN領域の挿入を伴わない、均一なTCRAV24AJ18遺伝子が使用されていることが大きな特徴である²⁾。これに対し、TCR β 鎖は、TCRBV11, 2, 8, 9, 13など限定されたTCR遺伝子ファミリーが用いられている³⁾。したがって、多様性の少ないヒトV α 24 iNKT細胞のTCRは、限定されたTCRリガンドを認識していることが示唆されている。1997年、ヒトV α 24 iNKT細胞のTCR遺伝子と、高度に相同性を示すTCR遺伝子再構成を有するマウスV α 14 iNKT細胞が、CD1d分子によって提示された α -ガラクトシルセラミド(α -galactosylceramide: α -GalCer)と呼ばれる糖脂質抗原によって活性化を受けることが明らかとなった³⁾。これに引き続いて α -GalCerは、ヒトV α 24 iNKT細胞をもCD1d分子拘束性に活性化することが明らかとなり、マウスV α 14 iNKT細胞/CD1d系が、ヒトV α 24 iNKT細胞/CD1d系として保存され、免疫応答に重要な役割を演じていることが示唆された⁴⁾。

TCRを介した抗原刺激により活性化されたiNKT細胞は、NK細胞、DC、B細胞、およびT細胞などを活性化し、自然免疫応答、および獲得免疫応答を活性化するのみならず、多様なエフェクター作用を有している⁵⁻⁸⁾。しかし、iNKT細胞には、Th2免疫応答を促進し、自己免疫応答を抑制する機能を有するという報告がある一方、IL-12産生を促進することにより誘導されるTh1免疫応答を促進し、腫瘍細胞の拒絶、あるいは感染防御に貢献するという報告もある⁹⁻¹⁵⁾。この矛盾する観察は、iNKT細胞には異なる機能を有するサブセットが存在し、これらのバランスの変化によって免疫応答性が制御されている可能性を示唆するものである。

ヒトV α 24 iNKT細胞は、CD4⁺、CD8⁺、およびCD4⁻CD8⁻ (double negative: DN)の3つのサブセットから構成されており、それぞれ異なるサイトカイン産生性を有している¹⁶⁾。近年、全身性強皮症¹⁷⁾、1型糖尿病¹⁸⁾、SLE¹⁹⁾、関節リウマチ²⁰⁾などの自己免疫疾患、およびアトピー性皮膚炎^{21, 22)}などのアレルギー性疾患の患者群において、特定のiNKTサブセットが減少していることが報告され、これらの疾患の病因、病態に深く関与していることが示唆されている。

一方、DCは樹状突起を有する抗原提示細胞 (antigen presenting cells: APCs) であり、造血幹細胞よりミエロイド系やリンパ球系分化経路を経て未熟樹状細胞 (immature dendritic cells: iDCs) へ分化し、さまざまな刺激により成熟樹状細胞 (mature dendritic cells: mDCs) へと最終的に分化する。生体においてDCは分化系列、成熟段階の異なる多様なサブセットとして末梢非リンパ組織やリンパ組織に広く存在しており、自然免疫と獲得免疫系を結ぶ免疫担当細胞として注目されている²³⁾。ヒト末梢血単球を前駆細胞として得られたミエロイド系DCでは、lipopolysaccharide (LPS)

による刺激などによりIL-12を多量に産生し、naive CD4⁺ T細胞からTh1細胞への分化を誘導する。このようなTh1細胞を分化誘導するDCは、DC1と呼ばれている。これに対し、naive CD4⁺ T細胞からTh2細胞への分化を誘導するDCをDC2と呼ぶ。これまで、ミエロイド系DCがDC1、リンパ球系 (形質細胞様) DCが、DC2とされてきたが、最近の詳細な解析から、培養条件、刺激条件により、ミエロイド系DCがDC1としてのみならずDC2としても機能し得ることが報告されている^{24, 25)}。

近年、ヒトCD1拘束性の自己反応性T細胞が、外来抗原非存在下でDC上のCD1分子を認識してDCの成熟を促進し、DCの異なる分化を促進することが相次いで報告された^{26, 27)}。しかし、ヒトV α 24 iNKTサブセットが、DCを介してTh1/Th2バランスを支配することにより、免疫応答性をいかに制御しているのかについての詳細な機序は明らかとされていない。

本研究では、CD4⁺、およびDN V α 24 iNKTサブセットが、DCの機能変化に及ぼす影響を、DCにおけるサイトカイン産生、表面分子の発現、リンパ球混合培養反応 (Mixed lymphocyte reaction; MLR) 誘導活性、naive CD4⁺ T細胞のTh1/Th2分化について比較検討を行った。

材料と方法

Monocyte (Mo) -DCの誘導

健常人ボランティアの末梢血からFicoll-Paqueを用いた比重遠心法により末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell; PBMC) を分離した。さらにこのPBMCsより、CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いてCD14陽性細胞を分離した。分離したCD14陽性細胞を6穴プレートに 2×10^6 /mlになるように調整し、100 U/ml recombinant human (rh) IL-4、および100 ng/ml rhGM-CSF (Primmune, Osaka, Japan) を加えた10%ウシ胎児血清 (FCS, fetal calf serum) 入りRPMI1640 (SIGMA, St Louis, MO) で5日間培養したものをmonocyte由来樹状細胞 (Mo-DC) として用いた (Fig. 1A)。

ヒトV α 24 iNKT細胞株の樹立

健常人末梢血単核細胞 (PBMCs) より、FITC標識抗ヒトTCRV α 24抗体 (CloneC15) (Beckman Coulter, Fullerton, CA)、FITC MicroBeads (Miltenyi Biotec) を用いてTCRV α 24陽性細胞を分離した (Fig. 1A)。抗原として10 ng/ml α -galactosylceramide (α -GalCer, KRN7000, Kirin Brewery, Gunma, Japan) を添加したMo-DCを抗原提示細胞 (APCs) とし、7日おきに複数回刺激することにより、 α -GalCer特異的ヒトV α 24 iNKT細胞株を樹立した。さらにFITC標識抗ヒトCD4抗体 (CloneRPA-T4) (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA)、抗ヒトCD8 β 抗体 (Clone2ST85H7)

(Beckman Coulter), FITC標識抗マウスIgG抗体 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA), およびFITC MicroBeads (Miltenyi Biotec) を用いて, CD4⁺ V α 24 iNKT, DN V α 24 iNKTの各サブセットを分離精製した (Fig. 2A). 分離した各V α 24 iNKT細胞サブセットは Flow cytometer (FACscan), および CellQuest software (BD Biosciences) を用いて解析, 確認を行った.

CD1 分子安定発現細胞株の樹立

Hela細胞への各CD1a, -b, -c, -d, -mock遺伝子の導入は, Transfectam reagent (Promega, Madison, WI) を用いたlipofection法により実施した. 遺伝子導入前日に6穴プレートに 2×10^5 /wellで培養した. 翌日, 無血清のDMEM (Invitrogen) で2回洗浄した後, 1 wellあたり neomycin耐性遺伝子を含む plasmid DNA $3 \mu\text{g}$, およびTransfectam溶液 $9 \mu\text{l}$ をそれぞれ個別に無血清のDMEM $500 \mu\text{l}$ に溶解し, 細胞に添加した. 37°C で1.5時間培養した後に上清を除去し, 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, $100 \mu\text{g/ml}$ streptomycin (Invitrogen), 10% FCSを含むDMEMに交換した. 72 時間培養した後, $1000 \mu\text{g/ml}$ G418 (Invitrogen) で薬剤選択を開始した.

C1R細胞株への各CD1遺伝子の導入はelectroporation法により実施した. C1R細胞株 (1×10^7) を無血清のRPMI1640, およびcytomix溶液²⁸⁾で洗浄した. これを plasmid DNA $50 \mu\text{g}$ を含むcytomix溶液 $500 \mu\text{l}$ に浮遊させ, 4 mm-gap electroporation cuvette (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 内で 4°C で静置した. 10 分後, Gene Pulser (Bio-Rad) を用いて電気穿孔 (400V , $960 \mu\text{F}$) を行った. 10 分間室温にて静置した後, 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, $100 \mu\text{g/ml}$ streptomycin, および 10% FCSを添加したRPMI 1640 で培養を行った. 72 時間後より, G418 ($1000 \mu\text{g/ml}$) で薬剤選択を開始した.

約2週間培養の後, CD1分子の発現をFlow cytometryにて確認した. 確認には, マウス抗ヒトCD1a (Clone: HI149) (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA), CD1b (CloneM-T101), CD1c (CloneL161) (Beckman Coulter), CD1d抗体 (CloneCD1d42) (BD Biosciences), およびFITC標識抗マウスIgG抗体 (Caltag Laboratories)を用いた. さらにCD1分子を高発現する細胞群は, FITC MicroBeads (Miltenyi Biotec) を用いて分離精製した.

V α 24 iNKT細胞増殖応答の評価

96穴平底プレート1 wellあたり, 各doseの α -GalCerを添加し, 放射線照射 (45 Gy) 処理したMo-DC (5.0×10^4)をAPCとして, V α 24 iNKT細胞株 (5.0×10^4) を共培養した. 48 時間培養後, $1 \mu\text{Ci/well}$ の ^3H -thymidineを添加し, さらに 16 時間後, 細胞をharvestし, scintillation counterで細胞内に取り込まれた ^3H -thymidineの放射能を計測した.

V α 24 iNKT細胞サイトカイン産生性の評価

96穴平底プレートの1 wellあたり, 各doseの抗原を添加し, 放射線照射 (45 Gy) 処理した 5×10^4 Mo-DC, あるいはCD1分子発現細胞株 (5.0×10^4) をAPCとして, V α 24 iNKT細胞株 (5.0×10^4) を共培養した. 24 時間後, 培養上清を回収し, ELISA法により定量した (Pierce Endogen, Rockford, IL).

Mo-DCにおけるサイトカイン産生性, および表面分子の発現の評価

48穴プレートの1 wellにつき, α -GalCer (20 ng/ml) 添加および無添加のMo-DC (3×10^5) と, 各V α 24 iNKT細胞サブセット (6.0×10^4) を共培養した. その際, α -GalCerによるV α 24 iNKT細胞の活性化に引き続く新たな蛋白合成を阻害する目的でV α 24 iNKT細胞をemetine (Sigma-Aldrich Co., St. Louis) で処理したものも用いた ($90 \mu\text{g/ml}$)²⁹⁾. 未熟DC (iDC) の成熟を誘導する陽性コントロール刺激として, $1 \mu\text{g/ml}$ *Escherichia coli* LPS (serotype 055 : B5, L2880, Sigma), 50 ng/ml rhTNF- α (PeproTech, Rocky Hill, NJ) を用いた. 24 時間後上清を回収し, 上清中のIL-12 p70をELISA法により定量した (Pierce Endogen) (Fig. 5).

DC上の表面分子は, Cy-chrome標識抗ヒトCD3抗体 (CloneHIT3a), PE標識抗ヒトCD83抗体 (CloneHB15e), およびFITC標識抗ヒトCD86抗体 (CloneFUN-1) (BD Biosciences) を用いて, Flow cytometryにより解析した (Fig. 6). この際に, 共培養で混入したV α 24 iNKT細胞とDCを区別するために, CD3陽性細胞をgate outしてDCの解析を行った.

DCのアロ (同種異系反応) 誘導活性の評価

DCのドナーとHLA-DRが共通していないドナーのPBMCsより, CD4⁺ T cell isolation kit II, およびCD45RO MicroBeads (Miltenyi Biotec) を用いて, CD4⁺CD45RO⁻細胞をnegative selectionし, これをアロのnaive CD4⁺ T細胞として用いた.

96穴丸底プレートの1 wellにつき, Mo-DC (1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , およびMo-DCなし) と, 各V α 24 iNKT細胞サブセット (2.0×10^3) を共培養した. 16 時間培養後, 放射線照射 (45 Gy) し, アロのnaive CD4⁺ T細胞 (3.0×10^4) を加え, 共培養を行った. 5 日後に $1 \mu\text{Ci/well}$ の ^3H -thymidineを添加し, さらに 8 時間後に ^3H -thymidineの取り込みを定量し, 増殖応答を評価した. 陽性コントロールの刺激として, LPS ($1 \mu\text{g/ml}$), TNF- α (50 ng/ml), rhCD40L 蛋白 ($5 \mu\text{g/ml}$); (R&D systems, Minneapolis, MN) を用いた (Fig. 7).

Th1 / Th2 分化の評価

48穴プレートの1 wellにつき, DC (2×10^5) と, 各V α 24 iNKT細胞サブセット (4.0×10^4) を共培養した. 16 時間培養後, 放射線照射 (45 Gy) し, アロのnaive CD4⁺ T細胞 (6.0×10^5) を加え共培養した. 6 日後にCD4⁺ T細胞を回収し, 96穴平底プレートに固

相化した抗ヒトCD3抗体 (clone HIT3a) と可溶性抗ヒトCD28抗体 (clone CD28.2) (BD Biosciences Pharmingen) によって刺激した。24時間後上清を回収し、上清中のIFN- γ 、およびIL-4をELISA法により定量した (Pierce Endogen) (Fig. 8)。

結果

ヒトV α 24 iNKT細胞株の樹立と抗原特異性の評価

α -GalCer特異的ヒトV α 24 iNKT細胞株を効率良く樹立するために、健康人PBMCsより、magnetic cell sorting法を用いてTCRV α 24陽性細胞を分離した (Fig. 1A)。抗原として10 ng/ml α -GalCerを添加したMo-DCを抗原提示細胞 (APCs) とし、TCRV α 24陽性細胞を刺激することにより、 α -GalCer特異的ヒトV α 24 iNKT細胞株を樹立した。樹立された細胞株は、CD161陽性、TCRV α 24陽性 (Fig. 1B)、V β 11陽性 (data not shown) であった。また、これらの細胞集団は α -GalCer濃度依存性に増殖応答を示したが、無関係な抗原であるcerebrosideには、全く増殖応答を示さなかった (Fig. 1C) ことから、 α -GalCer特異的ヒトV α 24 iNKT細胞株であることを確認した。

さらにCD4⁺、およびDN V α 24 iNKTサブセット

を、CD4およびCD8 β の発現を指標にmagnetic cell sorting法を用いて分離精製した (Fig. 2A, B)。

CD1分子を安定に発現する細胞株の樹立

C1R、およびHelaにCD1a, -b, -c、および-d遺伝子を導入した細胞集団から、各CD1分子に対する抗体を用いて、positive magnetic sorting法によりCD1分子の発現量の高い集団を得た。各transfectantは、CD1a, -b, -c、および-d分子を高レベルに発現していることを確認した (Fig. 3)。

CD4⁺V α 24 iNKT、およびDN V α 24 iNKTサブセットのサイトカイン産生性の評価

α -GalCer (100 ng/ml) を添加したCD1遺伝子安定発現C1R細胞株 (5.0×10^4)、HeLa細胞株 (5.0×10^4)、あるいはMo-DC (5.0×10^4) をAPCとして、それぞれのV α 24 iNKTサブセット (5.0×10^4) を刺激した。16時間後、培養上清中のIFN- γ 、IL-4、およびIL-10を定量することによりサイトカイン産生性の評価を行った。その結果、各V α 24 iNKTサブセットは、CD1d拘束性に α -GalCerを特異的に認識してIL-4、IFN- γ を産生したが、DCをAPCとした場合、CD4⁺V α 24 iNKTサブセットと比較し、DN V α 24 iNKTサブセットからのIL-4産生量が低いことが判明した ($p < 0.01$) (Fig. 4A, B)。

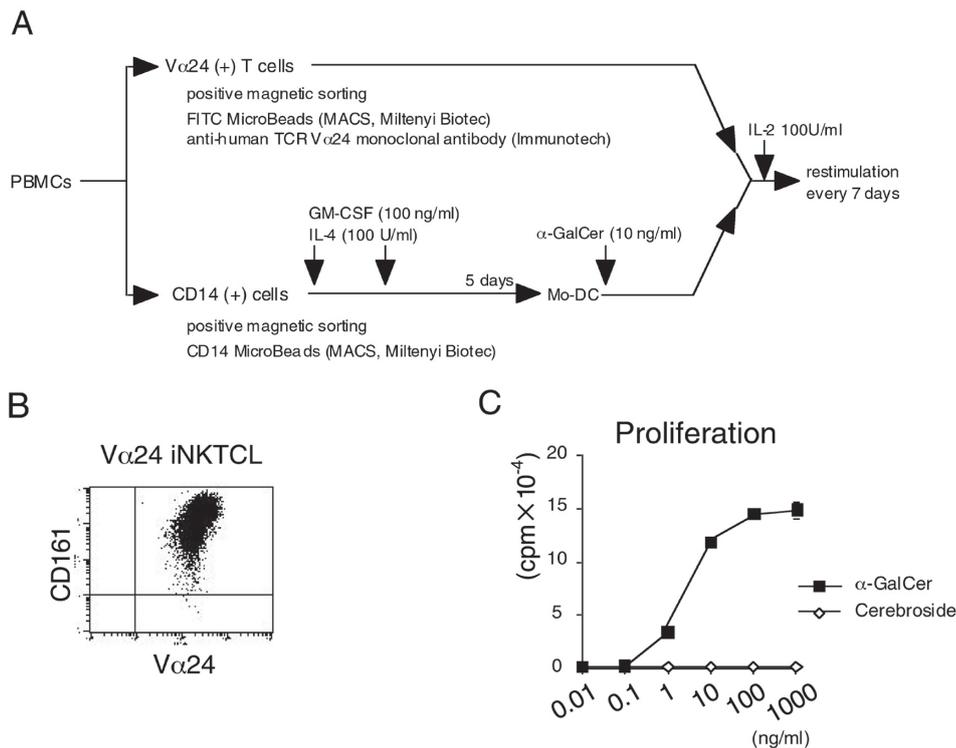


Fig. 1. A. ヒトV α 24 iNKT細胞株、およびMo-DCの樹立。健康人末梢血からCD14陽性細胞をCD14 MicroBeadsを用いて分離精製した。これにIL-4 50 ng/ml、およびGM-CSF 50 ng/mlを添加し5日間培養したものをMo-DCとした。これに、抗原として α -GalCer 10 ng/mlを添加し放射線照射したものをAPCとして、positive selectionで分離したV α 24陽性細胞を刺激した。増殖したT細胞は7日間毎に複数回刺激し、IL-2 (100 U/ml) を添加、維持することで α -GalCer特異的ヒトV α 24 iNKT細胞株を樹立した。B. ヒトV α 24 iNKT細胞株のflow cytometryを用いた解析。6回刺激後、樹立されたT細胞株を抗TCRV α 24抗体、および抗ヒトCD161抗体で染色した。C. α -GalCerに対するヒトV α 24 iNKT細胞株の増殖応答の評価V α 24陽性T細胞株を、各濃度の抗原を添加し放射線照射を行ったMo-DCと共培養した。無関係な抗原としてcerebrosideを使用した。培養液のみでの増殖応答は200 cpm以下であった。全てのdataはtriplicateの平均値である。

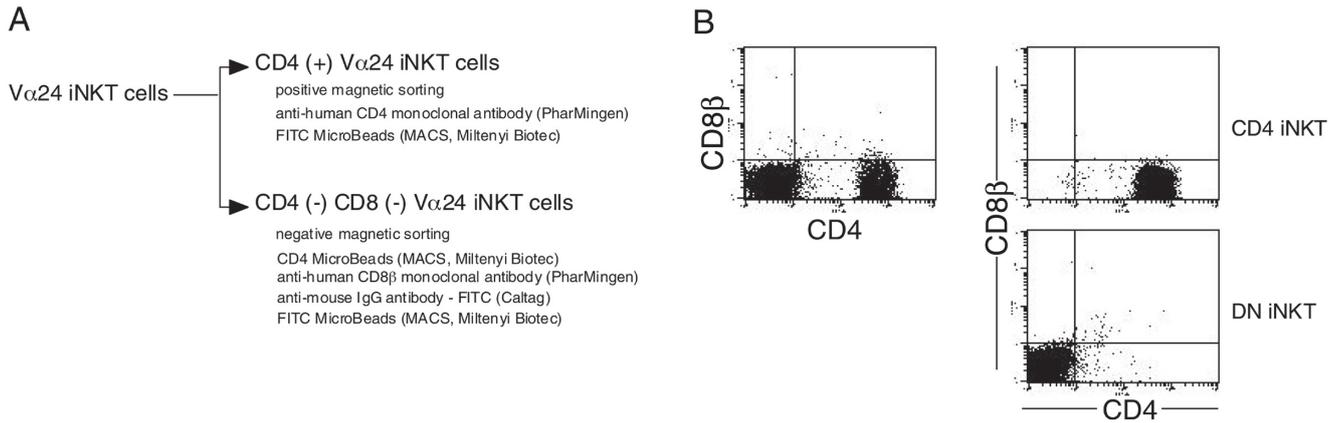


Fig. 2. A. CD4, およびDN Vα24 iNKT細胞のmagnetic cell sorting. Positive selection, あるいはnegative selectionに用いた抗体とMicroBeadsを示す. CD4⁺ Vα24 iNKT細胞は, FITC標識抗ヒトCD4抗体, およびFITC MicroBeadsを用いてpositive selectionした. DN Vα24 iNKT細胞は2段階に分けて分離した. 最初に, CD8β陽性細胞をマウス抗ヒトCD8β抗体, FITC標識抗マウスIgG抗体, およびFITC MicroBeadsを用いて除去した. 次に, CD4陽性細胞をCD4 MicroBeadsを用いて除去した. B. ヒトVα24 iNKT細胞の抗CD4抗体, および抗CD8β抗体を用いてのflow cytometryでの解析. 精製前後のVα24 iNKT細胞のフェノタイプをdot plotで示した. 分離したサブセットの精製度は99%以上であった.

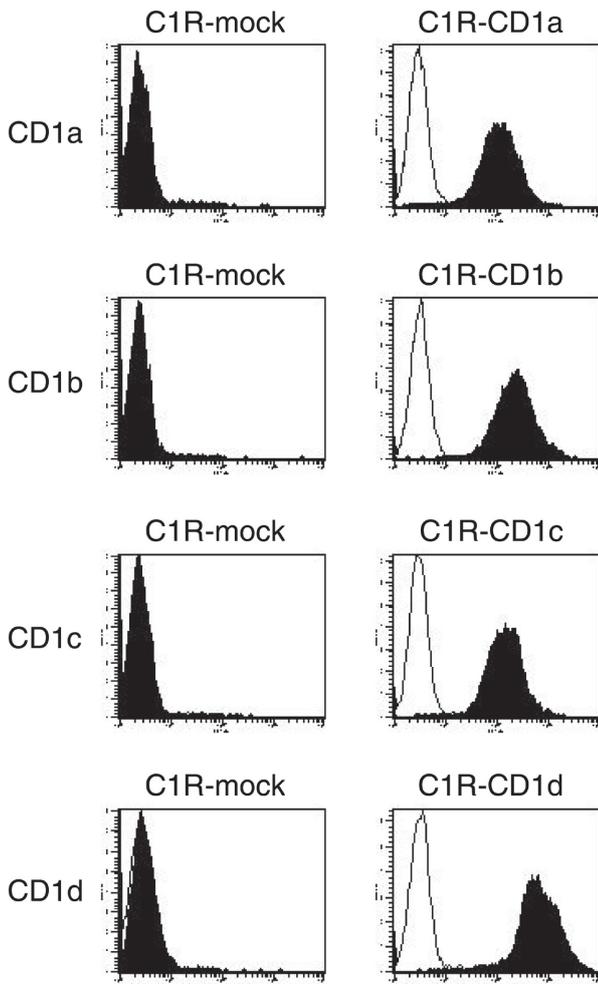


Fig. 3. CD1遺伝子導入C1R細胞株のflow cytometryを用いた解析. 遺伝子導入したC1R細胞株表面の各CD1分子の発現を抗ヒトCD1a, -b, -c, -d抗体を用いてflow cytometryで解析した. filled histogramは特異的抗体での染色を示す. open histogramはisotype controlを示す.

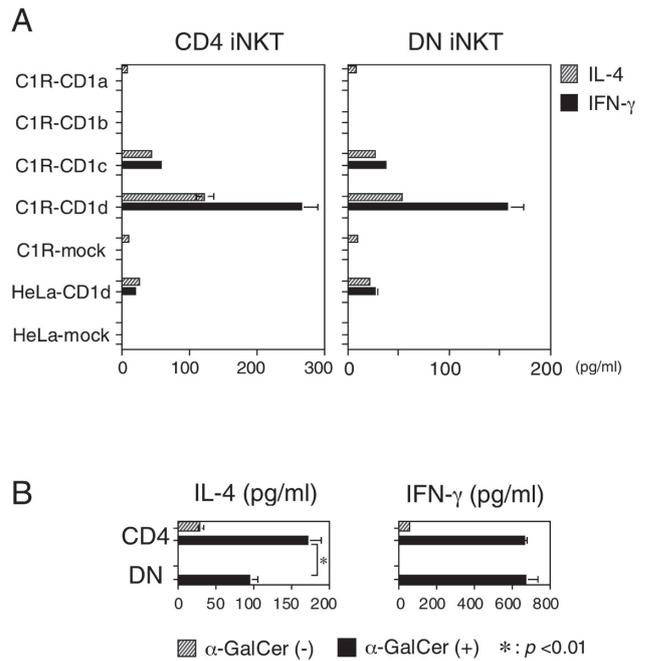


Fig. 4. CD4⁺, およびDN Vα24 iNKTサブセットのCD1分子を介してのα-GalCerに対する反応性. A. CD4⁺, およびDN Vα24 iNKT細胞サブセット (5.0×10^4 /well) を, 抗原としてα-GalCer 100 ng/mlを添加したCD1遺伝子導入C1R細胞株 (5.0×10^4 /well), およびHeLa細胞株 (5.0×10^4 /well) と共培養した. 24時間後にIFN-γ, およびIL-4の産生量を評価した. B. CD4⁺, およびDN Vα24 iNKT細胞サブセット (5.0×10^4 /well) を, 抗原としてα-GalCer 100 ng/mlを添加したMo-DC (5.0×10^4 /well) と共培養した. 24時間後にIFN-γ, IL-4の産生量を評価した. 全てのdataはtriplicateの平均値である. (*: $p < 0.01$)

CD4⁺ Vα24 iNKTサブセット, DN Vα24iNKTサブセットが, Mo-DCの成熟に及ぼす影響の評価

48穴プレートの1 wellにつき, Mo-DC (3.0 × 10⁵) と各Vα24 iNKTサブセット (6.0 × 10⁴) を24時間共培養し, Mo-DCのIL-12 p70産生性を評価した. その結果, α-GalCerによって活性化をされたそれぞれのVα24 iNKTサブセットと共培養したMo-DC (以下, α-GalCer活性化Vα24 iNKT/Mo-DCとする) にIL-12p70の産生が認められた. 特に, α-GalCer活性化CD4⁺ iNKT/Mo-DCは, α-GalCer活性化DN Vα24 iNKT/Mo-DCより多くのIL-12 p70を産生した (*p* < 0.01) (Fig. 5).

さらに, ヒトDCの成熟マーカーであるCD83分子およびCD86分子の発現を評価したところ, α-GalCer添加の有無, およびVα24 iNKTサブセットのemetine処理の有無に関らず, 各Vα24 iNKT/Mo-DCは, 無刺激のMo-DCと比較して, CD83分子, およびCD86分子の発現上昇を認めた. 特にCD86分子の発現は, 無刺激のMo-DCの2倍以上の上昇を認めた. さらに, α-GalCer活性化Vα24 iNKT/Mo-DCは, CD86分子の強い発現上昇 (MFI 300以上) を示し, LPS刺激されたMo-DCとほぼ同等の成熟を示した (Fig. 6A, B).

アロ反応性に及ぼす影響の評価

Mo-DC : naive CD4⁺ Tの割合を1 : 3, 1 : 30, 1 : 300, および, Mo-DCなしとしてアロ反応性を評価したところ, Mo-DC : naive CD4⁺ T=1 : 3では, 異なるVα24 iNKTサブセット間でアロ反応性に及ぼす影響に有意な差を認めなかった (not shown). しかし, Mo-

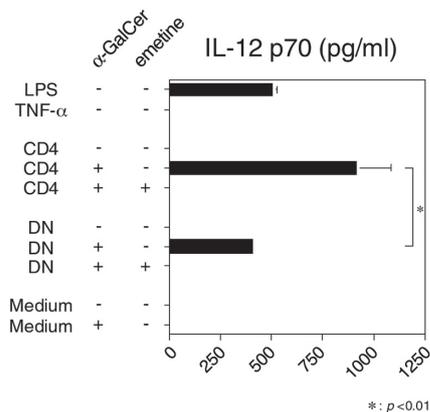


Fig. 5. CD4⁺, およびDN Vα24 iNKT細胞サブセットと共培養したMo-DCからのIL-12 p70の産生 CD4⁺, あるいはDN Vα24 iNKTサブセットを, α-GalCer (20 ng/ml) 添加, 未添加のMo-DCとT : DC=1:5の割合で共培養した. また, 蛋白合成阻害剤であるエメチン (90 μg/ml) で1時間処理したそれぞれのサブセットとα-GalCer添加のMo-DCとの共培養も行った. コントロールとしてLPS (1 μg/ml), およびTNF-α (50 μg/ml) を用いた. IL-12 p70の産生は24時間培養後の上清を用いて定量した. 全てのdataはtriplicateの平均値である. (*: *p* < 0.01)

DC : naive CD4⁺ T=1 : 30では, α-GalCer活性化 DN Vα24 iNKT/Mo-DCは, 著しくアロ反応性を抑制した. さらに, このemetine処理のものを用いた場合には, アロ反応抑制活性は消失していた. また, α-GalCerを添加せず, 活性化を受けないDN Vα24 iNKTサブセットと共培養したMo-DC (以下, 活性化(-) DN Vα24 iNKT/Mo-DCとする) は, アロ反応抑制活性は示さなかった (*p* < 0.01) (Fig. 7). α-GalCer活性化DN Vα24

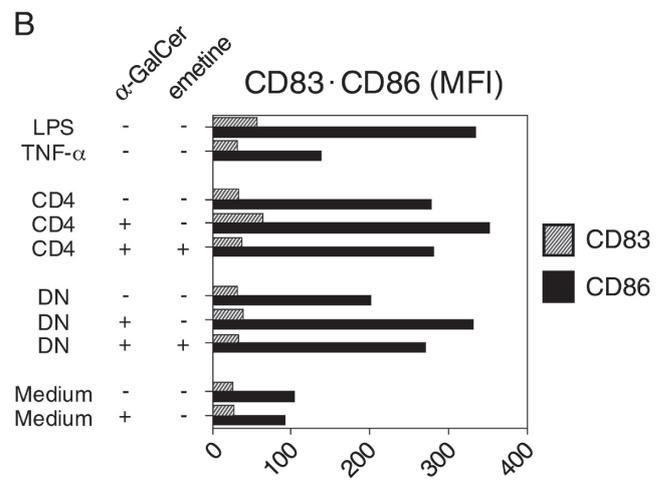
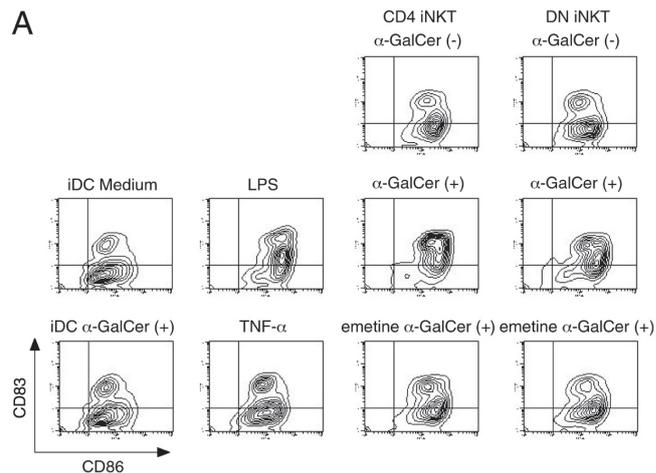


Fig. 6. CD4⁺, あるいはDN Vα24 iNKT細胞サブセットと共培養したMo-DCのCD83, およびCD86分子の発現. A. CD4⁺, あるいはDN Vα24 iNKTサブセットを, α-GalCer (20 ng/ml) 添加, 未添加のMo-DCとT : DC=1:5の割合で24時間共培養した. また, 蛋白合成阻害剤であるエメチン (90 μg/ml) で1時間処理したそれぞれのサブセットとα-GalCer添加のMo-DCとの共培養も行った. コントロールとしてLPS (1 μg/ml), およびTNF-α (50 μg/ml) を用いた. PE標識抗ヒトCD83抗体, FITC標識抗ヒトCD86抗体, およびCy-Chrome標識抗ヒトCD3抗体を用いてflow cytometryで解析を行った. CD3陽性細胞はVα24 iNKT細胞を除外する目的でgate outした. B. CD4⁺, あるいはDN Vα24 iNKT細胞サブセットと共培養したMo-DCのCD83, CD86分子の発現の概要. Dataはmean fluorescent intensityで示した.

iNKT/Mo-DCのアロ反応抑制効果は、emetine処理により消失することから、抗原特異的な刺激を受けて新たに合成される蛋白が、抑制性DCの分化に影響を与えているものと考えられる。

naive CD4⁺ T細胞におけるTh1/Th2 分化に及ぼす影響の評価

Mo-DC : Vα24 iNKTサブセット = 5 : 1, Mo-DC : naive CD4⁺ T = 1 : 3で評価した場合、各Vα24 iNKTサブセットと共培養されたMo-DCは、すべての条件下で、naive CD4⁺ T細胞にIFN-γ産生を誘導した。しかし、α-GalCer活性化CD4⁺ Vα24 iNKT/Mo-DCによって刺激されたnaive CD4⁺ T細胞からのIFN-γ産生は、活性化(-) CD4⁺ Vα24 iNKT/Mo-DCのものに比べ著しく高かった。一方、α-GalCer活性化DN Vα24 iNKT/Mo-DCによって刺激されたnaive CD4⁺ T細胞からのIFN-γ産生は、活性化(-) DN Vα24 iNKT/Mo-DCのものに比べ低かった。Th2サイトカインであるIL-4は、α-GalCer活性化CD4⁺ およびDN Vα24 iNKT/Mo-DCによって刺激されたnaive CD4⁺ T細胞より産生が認められた。特に、α-GalCer活性化DN Vα24 iNKT/Mo-DCは、IL-4産生誘導能が著しく高かった ($p < 0.001$) (Fig. 8)。これらの効果は、emetineによって処理された各Vα24 iNKTサブセットを用いた場合では消失することから、これらのサブセット

が抗原特異的な刺激を受けて新たに合成する蛋白が、DC1/DC2の分化に大きく影響を与えているものと考えられる。

考 察

1998年、Wilson SBらによって、1型糖尿病の双生児および三胎児では、DN Vα24 iNKTサブセットが著しく減少していることが報告された¹⁸⁾。特に1型糖尿病進行性の患者では、DN Vα24 iNKTサブセットは、IFN-γのみを産生しIL-4を産生しないことから、DN Vα24 iNKTサブセットからのIL-4産生の欠如が、Th1優位な免疫応答を誘導し、1型糖尿病発症を促進するものと考えられている。また、種々の自己免疫疾患、あるいはアレルギー性疾患患者においてDN Vα24 iNKT細胞の減少、および機能不全が相次いで報告され、DN Vα24 iNKTサブセットがこれらの病因、病態に関与することが示唆されてきた。

NODマウスを用いた研究では、α-GalCerを投与することにより膵臓所属リンパ節にNKT細胞、およびミエロイド系DCが集積し、これらのDCからのIL-12産生が減少して病態が改善されることが報告されている³⁰⁾。しかし、マウスにはCD1a, -b, -c分子が存在せず、そのDCの分化にTSLPが関与しないなど、DCとNKT細胞を取り巻く分子環境はヒトとは大きく異なっている。

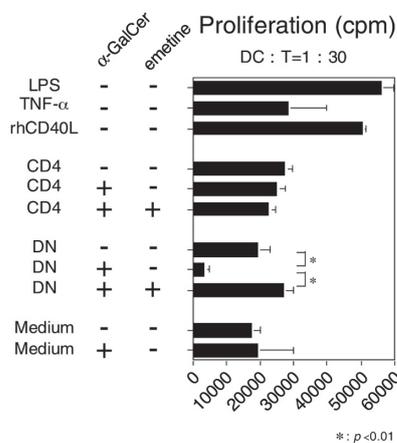


Fig. 7. CD4⁺、あるいはDNサブセットと共培養したMo-DCに対するアロナイーブCD4⁺ T細胞の増殖応答性の評価。CD4⁺、あるいはDN Vα24 iNKTサブセットとα-GalCer (20 ng/ml) 添加、未添加のMo-DCをT:DC=1:5の割合で24時間共培養した。さらに、刺激されたDCをMLRに用いた。responder cellとして、PBMCsからmagnetic cell sortingで分離したアロナイーブCD4⁺ T細胞を用いた。stimulator cellのMo-DCとresponder cell (3.0×10⁴/well) の比を各割合にし、96穴丸底プレートで6日間共培養した。 [³H]-thymidine (1 μCi) を最後の8時間で添加した。培養終了後、細胞を回収し、 [³H]-thymidineの取り込みをscintillation counterで測定した。Dataはstimulator : responder比1:30で培養されたアロナイーブCD4⁺ T細胞の増殖応答を示す。全てのdataはtriplicateの平均値である。 (*: $p < 0.01$)

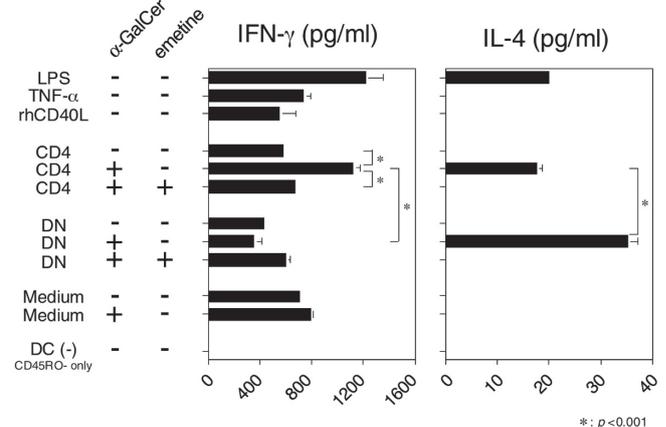


Fig. 8. CD4⁺、あるいはDNサブセットと6日間共培養されたMo-DCに対するアロナイーブCD4⁺ T細胞のサイトカイン産生性の評価。CD4⁺、あるいはDN Vα24 iNKTサブセットとα-GalCer (20 ng/ml) 添加、未添加のMo-DCをT:DC=1:5の割合で24時間共培養した。さらに、共培養されたDCをMLRに用いた。responder cellとして、PBMCsからmagnetic cell sortingで分離したアロナイーブCD4⁺ T細胞を用いた。stimulator cellのMo-DC (1.0×10⁴/well) とresponder cell (3.0×10⁴/well) を96穴丸底プレートで共培養した。6日間培養後、Mo-DCによってprimingされたCD4⁺ T細胞を回収し、これを固相化した抗ヒトCD3抗体 (10 μg/ml)、および可溶性抗ヒトCD28抗体 (1 μg/ml) を添加することで、24時間刺激した。上清中のサイトカイン (IL-4、およびIFN-γ) をELISA法で評価した。全てのdataはtriplicateの平均値である。 (*: $p < 0.001$)

そこで我々は、CD4⁺ V α 24 iNKTサブセットとDN V α 24 iNKTサブセットは、ヒト生体内において異なる免疫制御機構を有しており、DCを介してそれぞれが異なるTh分化を誘導しているのではないかという仮説をたて、CD4⁺、およびDN V α 24 iNKTサブセットに分離精製し、独自のシステムを用いて検証した。解析には、ヒト生体内に存在するミエロイド系DCの主要なサブセットであるCD1c (BDCA-1)⁺ DCに類似し、*in vitro*で誘導する方法が確立されているmonocyte由来DC (Mo-DC)を用いた。

我々が樹立した健康人由来のCD4⁺、およびDN V α 24 iNKTサブセットは、ともにCD1d分子拘束性に α -GalCerを認識し、Th1サイトカインであるIFN- γ 、およびTh2サイトカインであるIL-4を産生した (Fig. 4A)。しかし、DN V α 24 iNKTサブセットの産生するIL-4は、CD4⁺ V α 24 iNKTサブセットのものに比較して少ないため (Fig. 4B)、自己免疫疾患に認められる過剰なTh1応答を抑制するためのIL-4の供給源として考えるのは困難である。むしろ、DN V α 24 iNKTサブセットのサイトカイン産生性から考慮すると、以前から考えられていたように、このサブセットがTh1応答に重要な役割を演じているように思われた¹⁶⁾。しかし、実際に*in vitro* T細胞分化誘導システムを用いて得られた結果は異なっていた。それを以下にまとめる。

α -GalCer活性化CD4⁺、およびDN V α 24 iNKTサブセットと共培養されたDCは、ともにCD83分子、CD86分子の発現上昇を示したが、サブセットの違いによる変化を認めなかった (Fig. 6)。DCによるIL-12 p70の産生は、 α -GalCer活性化CD4⁺、およびDN V α 24 iNKTサブセットと共培養した場合に観察された。特に、 α -GalCer活性化CD4⁺ V α 24 iNKTサブセットと共培養されたDCによるIL-12 p70の産生は、 α -GalCer活性化DN V α 24 iNKTサブセットと共培養されたDCに比べ、有意に高い値を示した (Fig. 5)。DCから産生されるIL-12 p70は、Th1細胞分化を誘導する上で重要なサイトカインであるため、 α -GalCer活性化CD4⁺ V α 24 iNKTサブセットが、DCを介してTh1応答を優位に誘導する可能性が示唆された。

実際に、Th分化をアロMLR反応を用いて評価したところ、 α -GalCer活性化DN V α 24 iNKT/Mo-DCは、DC : naive CD4⁺ T細胞比が1 : 30のときにアロMLR誘導活性を抑制した (Fig. 7)。この現象は α -GalCer活性化CD4⁺ V α 24 iNKTサブセットの場合には認められなかった。さらに、 α -GalCer活性化CD4⁺ V α 24 iNKT/Mo-DCによって刺激されたnaive CD4⁺ T細胞は、Th1に分化した。一方、 α -GalCer活性化DN V α 24 iNKT/Mo DCによって刺激されたnaive CD4⁺ T細胞は、IFN- γ の低産生性とIL-4の高産生性を示すTh2に分化した (Fig. 8)。この効果は、蛋白合成阻害剤であるemetineによって処理された各V α 24 iNKTサブセッ

トを用いた場合に消失することから、これらのサブセットが抗原特異的な刺激を受けて新たに合成する蛋白が、DC1/DC2の分化に大きく影響を与えているものと考えられる。したがって、 α -GalCer活性化DN V α 24 iNKTサブセットは、DCのアロMLR誘導活性を抑制し、なおかつnaive CD4⁺ T細胞をTh2分化にシフトさせるDC2を誘導する。この現象は、単にV α 24 iNKT細胞サブセットが活性化を受けて産生するサイトカイン産生プロファイルからは予測できないものであったが、DN V α 24 iNKTサブセットの減少あるいは機能不全が自己免疫現象の発症に関与するという前述の可能性と一致する。

以上より、V α 24 iNKTサブセットのバランスは、末梢におけるTh1/Th2バランスを制御する重要な要因となっている可能性がある。これまで癌、自己免疫疾患の治療において α -GalCerの投与が試されてきたが、特定のV α 24 iNKTサブセットを動員することにより、Th1、またはTh2にシフトした有効な応答を起こすことが可能かもしれない。1型糖尿病患者をはじめ、種々の自己免疫疾患患者のV α 24 iNKTサブセットが、DCを介してTh分化をいかに誘導しているかは今後の研究課題である。

結 論

異なるヒトV α 24 iNKT細胞のサブセット (CD4/DN) は、DCを介してnaive CD4⁺ T細胞の異なる分化 (Th1/Th2) を誘導することを明らかにした。ヒトV α 24 iNKT細胞のサブセットのバランスを制御することにより、Th1/Th2応答を人為的に制御できる可能性を示唆する。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導いただきました埼玉医科大学産婦人科学講座教授、石原 理先生、畑 俊夫先生、埼玉医科大学免疫学講座教授、松下 祥先生に心より感謝いたします。また、埼玉医科大学免疫学講座助手、植村靖史先生をはじめ埼玉医科大学免疫学講座、埼玉医科大学産婦人科学講座の教室員の皆様から多くの御協力をしていただきましたことに深く感謝いたします。CD1遺伝子発現ベクターを御恵与していただきました米国ハーバード大学、Steven Porcelli博士に深く感謝いたします。また、 α -ガラクトシルセラミドを御提供くださいましたキリンビール株式会社に深謝致します。

引用文献

- 1) Exley M, Garcia J, Balk SP, Porcelli S. Requirements for CD1d recognition by human invariant V α 24⁺ CD4⁻CD8⁻ T cells. *J Exp Med* 1997;186:109-20.
- 2) Porcelli S, Yockey CE, Brenner MB, Balk SP. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression

- by human peripheral blood CD4⁻8⁻ α/β T cells demonstrates preferential use of several V β genes and an invariant TCR α chain. *J Exp Med* 1993; 178:1-16.
- 3) Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of V α 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 1997;278:1626-9.
 - 4) Spada FM, Koezuka Y, Porcelli SA. CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells. *J Exp Med* 1998; 188:1529-34.
 - 5) Tomura M, Yu WG, Ahn HJ, Yamashita M, Yang YF, Ono S, et al. A novel function of V α 14⁺CD4⁺NKT cells: stimulation of IL-12 production by antigen-presenting cells in the innate immune system. *J Immunol* 1999;163:93-101.
 - 6) Akbari O, Stock P, Meyer E, Kronenberg M, Sidobre S, Nakayama T, et al. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 2003;9:582-8.
 - 7) Stein-Streilein J. Invariant NKT cells as initiators, licensors, and facilitators of the adaptive immune response. *J Exp Med* 2003;198:1779-83.
 - 8) Taniguchi M, Seino K, Nakayama T. The NKT cell system: bridging innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2003;4:1164-5.
 - 9) Yoshimoto T, Bendelac A, Watson C, Hu-Li J, Paul WE. Role of NK1.1⁺ T cells in a TH2 response and in immunoglobulin E production. *Science* 1995;270:1845-7.
 - 10) Singh N, Hong S, Scherer DC, Serizawa I, Burdin N, Kronenberg M, et al. Cutting edge: activation of NK T cells by CD1d and α -galactosylceramide directs conventional T cells to the acquisition of a Th2 phenotype. *J Immunol* 1999;163:2373-7.
 - 11) Laloux V, Beaudoin L, Jeske D, Carnaud C, Lehuen A. NK T cell-induced protection against diabetes in V α 14-J α 281 transgenic non-obese diabetic mice is associated with a Th2 shift circumscribed regionally to the islets and functionally to islet autoantigen. *J Immunol* 2001;166:3749-56.
 - 12) Cui J, Watanabe N, Kawano T, Yamashita M, Kamata T, Shimizu C, et al. Inhibition of T helper cell type 2 cell differentiation and immunoglobulin E response by ligand-activated V α 14 natural killer T cells. *J Exp Med* 1999;190:783-92.
 - 13) Cui J, Shin T, Kawano T, Sato H, Kondo E, Toura I, et al. Requirement for V α 14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 1997;278: 1623-6.
 - 14) Kawamura T, Takeda K, Mendiratta SK, Kawamura H, Van Kaer L, Yagita H, et al. Critical role of NK1⁺ T cells in IL-12-induced immune responses in vivo. *J Immunol* 1998;160:16-9.
 - 15) Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, et al. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* 2000;191:661-8.
 - 16) Takahashi T, Chiba S, Nieda M, Azuma T, Ishihara S, Shibata Y, et al. Cutting edge: analysis of human V α 24⁺ CD8⁺ NK T cells activated by α -galactosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2002;168:3140-4.
 - 17) Sumida T, Sakamoto A, Murata H, Makino Y, Takahashi H, Yoshida S, et al. Selective reduction of T cells bearing invariant V α 24 J α Q antigen receptor in patients with systemic sclerosis. *J Exp Med* 1995;182:1163-8.
 - 18) Wilson SB, Kent SC, Patton KT, Orban T, Jackson RA, Exley M, et al. Extreme Th1 bias of invariant V α 24 J α Q T cells in type 1 diabetes. *Nature* 1998;391:177-81.
 - 19) Sumida T, Maeda T, Taniguchi M, Nishioka K, Stohl W. TCR AV24 gene expression in double negative T cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1998;7:565-8.
 - 20) Kojo S, Adachi Y, Keino H, Taniguchi M, Sumida T. Dysfunction of T cell receptor AV24AJ18⁺, BV11⁺ double-negative regulatory natural killer T cells in autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 2001;44: 1127-38.
 - 21) Oishi Y, Sakamoto A, Kurasawa K, Nakajima H, Nakao A, Nakagawa N, et al. CD4⁻CD8⁻ T cells bearing invariant V α 24 J α Q TCR α -chain are decreased in patients with atopic diseases. *Clin Exp Immunol* 2000;119:404-11.
 - 22) Takahashi T, Nakamura K, Chiba S, Kanda Y, Tamaki K, Hirai H. V α 24⁺ natural killer T cells are markedly decreased in atopic dermatitis patients. *Hum Immunol* 2003;64:586-92.
 - 23) Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.
 - 24) Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 2000;1:311-6.
 - 25) Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M.

- Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol* 2000;1:305-10.
- 26) Vincent MS, Leslie DS, Gumperz JE, Xiong X, Grant EP, Brenner MB. CD1-dependent dendritic cell instruction. *Nat Immunol* 2002;3:1163-8.
- 27) Leslie DS, Vincent MS, Spada FM, Das H, Sugita M, Morita CT, et al. CD1-mediated γ / δ T cell maturation of dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 196:1575-84.
- 28) Van den Hoff MJ, Moorman AF, Lamers WH. Electroporation in 'intracellular' buffer increases cell survival. *Nucleic Acid Res* 1992;20:11.
- 29) Matsuoka T, Tabata H, Matsushita S. Monocytes are differentially activated through HLA-DR, -DQ, and -DP molecules via mitogen-activated protein kinases. *J Immunol* 2001;166:2202-8.
- 30) Naumov YN, Bahjat KS, Gausling R, Abraham R, Exley MA, Koezuka Y, et al. Activation of CD1d-restricted T cells protects NOD mice from developing diabetes by regulating dendritic cell subsets. *Proc Nat Acad Sci USA* 2001;98:13838-43.