



Title	A novel function of V $\alpha$ 14+CD4+NKT cells : stimulation of IL-12 production by antigen-presenting cells in the innate immune system
Author(s)	戸村, 道夫
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42707">https://hdl.handle.net/11094/42707</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	とむらみちお 戸村道夫
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 8 8 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 13 年 2 月 28 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	A novel function of $V\alpha 14^+CD4^+NKT$ cells : stimulation of IL-12 production by antigen-presenting cells in the innate immune system. ( $V\alpha 14^+CD4^+NKT$ 細胞の新しい機能：自然免疫系における抗原提示細胞からの IL-12 産生刺激)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 濱岡 利之  (副査) 教 授 平野 俊夫    教 授 宮坂 昌之

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

免疫応答の Th1/Th2 分化において、IL-4 は Th2 応答の誘導、IL-12 及び IFN- $\gamma$  は Th1 応答の誘導に重要である。そして、T 細胞活性化の初期段階で存在するサイトカインが Th1/Th2 分化に重要であることから、自然免疫系の応答が Th1/Th2 分化に影響を与えるという仮説が提唱されてきた。自然免疫系において、class I 類似分子である CD1d を認識する  $V\alpha 14^+TCR^+NK1.1^+T$  ( $V\alpha 14^+NKT$ ) 細胞は抗 CD3 抗体で刺激すると短時間に大量の IL-4 を産生することから、Th2 応答の誘導に関わる可能性が考えられてきた。しかし一方、Th1 分化に重要なサイトカインである IL-12 産生に  $V\alpha 14^+NKT$  細胞が如何に関わっているかは、全くわかっていない。そこで本研究は、 $V\alpha 14^+NKT$  細胞と抗原提示細胞 (APC) の相互作用によって誘導されるサイトカイン、特に IL-12 の産生について検討し、その産生機構を明らかにすることを目的とした。

#### 【方法】

$V\alpha 14^+NKT$  細胞の TCR を特異的に刺激する抗原として、APC の CD1d によって提示される  $\alpha$ -Galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) を用いた。培養上清及び血清中の IL-12 は Ab-capture assay で、IL-4 及び IFN- $\gamma$  は ELISA 法により定量した。

#### 【成績】

(1) C57BL/6 系マウスの脾細胞から B 細胞を除去した画分に、 $\alpha$ -GalCer を加えて培養した所、培養上清中には IL-4、IFN- $\gamma$  に加え IL-12 の産生が認められた。そして、この IL-12 産生は抗 CD40L 抗体の添加により完全に抑制された。また、 $\beta_2$ -microglobulin $^{-/-}$  (CD8 $^+$ T 細胞及び NKT 細胞が欠損) 及び  $J\alpha 281TCR^{-/-}$  ( $V\alpha 14^+NKT$  細胞のみ欠損) では  $\alpha$ -GalCer で刺激しても IL-12 は産生されなかった。それに対し、 $A\beta^b^{-/-}$  マウス (class II 拘束性 CD4 $^+$ T 細胞のみ欠損し、 $V\alpha 14^+NKT$  細胞は存在) では  $\alpha$ -GalCer により IL-12 が産生された。これらの結果から、活性化した  $V\alpha 14^+NKT$  細胞は CD40L-CD40 経路を介して、APC からの IL-12 産生を誘導することが示された。(2)  $V\alpha 14^+NKT$  細胞は CD4 と CD4 $^+$ 亜集団よりなるが、 $V\alpha 14^+NK$  細胞を活性化した後に CD40L の発現をフローサイトメトリーで調べたところ、CD4 $^+$ 亜集団にのみ発現が認められた。また、CD4 $^+$  $V\alpha 14^+NKT$  細胞の存在する画分を  $\alpha$ -GalCer で刺激したときのみ IL-12 産生が認められた。従って、 $V\alpha 14^+NKT$  細胞の中でも CD4 $^+$ 亜集団が、活性化により CD40L を発現し APC からの IL-12 産生を誘導することが示された。(3) 更に、 $\alpha$ -GalCer 刺激時に抗 IL-12 抗体

を添加したところ、IFN- $\gamma$  産生はほとんど抑制され、IL-4産生は変わらなかった。従って、V $\alpha$ 14<sup>+</sup>NKT 細胞の活性化によって誘導される IFN- $\gamma$  の大部分は、endogenous に産生された IL-12により二次的に産生されていることが示された。(4)  $\alpha$ -GalCer をマウスに投与し脾臓での mRNA の発現を RNAse protection assay で検出したところ、投与3-6時間後に IL-12 p35 及び p40mRNA の発現が認められ、血清中に6-9時間をピークに IL-12が検出された。また、IFN- $\gamma$  は投与後18時間以降まで高濃度で持続的に検出されたのに対し、IL-4は投与後3時間をピークとする一過性の産生が認められた。

#### 【総括】

V $\alpha$ 14<sup>+</sup>NKT 細胞の中でも活性化した CD4<sup>+</sup>V $\alpha$ 14<sup>+</sup>NKT 細胞亜集団が CD40L を発現し、APC 上の CD40を刺激することによって APC からの IL-12産生を誘導すること、そして、産生された IL-12は V $\alpha$ 14<sup>+</sup>NKT 細胞活性化によって誘導される IFN- $\gamma$  産生を二次的に誘導していることが明らかとなった。従来、V $\alpha$ 14<sup>+</sup>NKT 細胞は IL-4を産生することから Th2分化に関わる可能性が考えられてきた。しかし、当研究の知見により V $\alpha$ 14<sup>+</sup>NKT 細胞は IL-12産生を誘導することによって Th1分化にも関わっている可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

免疫応答の Th1/Th2分化において、IL-4は Th2応答の誘導、IL-12及び IFN- $\gamma$  は Th1応答の誘導に重要である。そして、T細胞活性化の初期段階で存在するサイトカインが Th1/Th2分化に重要であることから、自然免疫系の応答が Th1/Th2分化に影響を与えるという仮説が提唱されてきた。自然免疫系において、class I 類似分子である CD1d を認識する V $\alpha$ 14TCR<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>T (V $\alpha$ 14<sup>+</sup>NKT) 細胞は抗 CD3抗体で刺激すると短時間に大量の IL-4を産生することから、Th2応答の誘導に関わる可能性が考えられてきた。一方、V $\alpha$ 14<sup>+</sup>NKT 細胞は Th1サイトカインである IFN- $\gamma$  を産生することも分かっている。しかし更に、抗原提示細胞から分泌され、Th1分化に重要なサイトカインである IL-12の産生に V $\alpha$ 14<sup>+</sup>NKT 細胞が如何に関わっているかは全くわかっていない。そこで本研究は、V $\alpha$ 14<sup>+</sup>NKT 細胞と抗原提示細胞 (APC) の相互作用によって誘導されるサイトカイン、特に IL-12の産生について検討し、その産生機構を解析した。V $\alpha$ 14<sup>+</sup>NKT 細胞の選択的な活性化は、抗原提示細胞の CD1d によって提示される糖脂質抗原である  $\alpha$ -Galactosylceramide により行った。 $\alpha$ -Galactosylceramide を *in vitro* 培養系に添加、あるいはマウスに投与して、V $\alpha$ 14<sup>+</sup>NKT 細胞を活性化したところ、いずれの場合にも、IL-12の産生が誘導された。そこでさらにその産生機構を解析すると、V $\alpha$ 14<sup>+</sup>NKT 細胞の中でも活性化した CD4<sup>+</sup>V $\alpha$ 14<sup>+</sup>NKT 細胞亜集団が CD40L を発現し、APC 上の CD40を刺激することによって APC からの IL-12産生を誘導することが明らかとなった。更に、V $\alpha$ 14<sup>+</sup>NKT 細胞活性化によって誘導される IFN- $\gamma$  産生は、産生された IL-12によって二次的に誘導されていることも示された。従来、V $\alpha$ 14<sup>+</sup>NKT 細胞は IL-4を産生することから Th2分化に関わる可能性が考えられてきた。しかし、当研究の知見により V $\alpha$ 14<sup>+</sup>NKT 細胞は IL-12産生を誘導することによって Th1分化にも関わっている可能性が示唆された。

以上より、本研究は自然免疫系において CD4<sup>+</sup>V $\alpha$ 14<sup>+</sup>NKT 細胞が抗原提示細胞からの IL-12産生を誘導するという生物学的に重要な知見を提供するものであり、学位の授与に値すると思われる。