

氏 名	たか はし かず や 高 橋 和 也
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1798 号
学位授与の日付	平 成 15 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Natural killer type 2 bias in remission of multiple sclerosis (多発性硬化症寛解期におけるナチュラルキラー細胞のタイプ2偏倚)
論文調査委員	(主 査) 教 授 三 森 経 世 教 授 坂 口 志 文 教 授 柴 崎 浩

論 文 内 容 の 要 旨

近年多発性硬化症 (MS) を抑制しうる種々の免疫調節性細胞が注目されている。T ヘルパー (Th) 1 型自己免疫性疾患である MS の動物モデルとして知られている実験的自己免疫性脳脊髄炎においては、調節性 $\alpha\beta$ T 細胞, ナチュラルキラー (NK) 細胞, B 細胞の免疫調節的役割が報告されている。多くの MS 患者は非活動期である寛解期を過ごしており、寛解期の維持に調節性細胞が積極的に関与している可能性が推測できる。

一方ヒト NK 細胞は、サイトカイン産生パターンから少なくとも 2 つのサブセットに分類できることが判明した。インターロイキン (IL-) 12 存在下ではインターフェロン (IFN-) γ , IL-10 を産生し CD95 抗原を強発現する NK1 細胞, IL-4 存在下では IL-5, IL-13 を産生し CD95 抗原を弱発現する NK2 細胞に偏倚する。

今回 MS 寛解期 NK 細胞のサイトカインプロファイルを健常人と比較検討することで、NK1, NK2 細胞の寛解期における役割を検討した。

方法

対象と検体の分離: 3 ヶ月以上無治療で臨床上、MRI 上ともに再発を認めない寛解期の MS 患者 22 名, 対照コントロール 30 名から末梢血を採取し、直ちに末梢血単核球 (PBMC) に分離した。NK 細胞, T 細胞は PBMC から磁気ビーズを用いネガティブセレクションで分離した。

培養: NK1, NK2 細胞は PBMC から Peritt らの方法を用い培養した。また各細胞の刺激には PMA/ionomycin を使用した。

フローサイトメトリー: 各細胞は蛍光標識抗体で染色し、フローサイトメーターにより表面抗原、細胞内サイトカインの解析を行なった。

ELISA: 培養上清はサイトカイン定量のため市販の ELISA キットを用いて解析した、

RT-PCR: NK 細胞から total RNA を抽出した後 cDNA に変換した。IFN- γ , IL-5, IL-13, IL-10, TGF β 1, b-actin は通常の RT-PCR を、また IFN- γ , IL-5, IL-12R β 2 はライトサイクラーを用いた定量的 RT-PCR も同時に行った。

結果と考察

通常の RT-PCR を用いた寛解期 MS 患者の NK 細胞サイトカイン産生パターンは、コントロール群と違いを認めなかった。しかし、定量的 RT-PCR また ELISA 法により IL-5 の産生量が MS 群で有意に増加していることが見いだされた。IL-5 産生は NK2 細胞の特徴であり、寛解期 MS 患者の NK 細胞は NK2 に偏倚している可能性が示唆された。さらに CD95 発現を検討した結果、寛解期 MS 患者の NK 細胞ではコントロール群に比し、CD95 弱陽性発現細胞が有意に増加しており、NK2 偏倚に矛盾しない結果が得られた。寛解期における NK2 偏倚と病態との関係を調べるため、再発時 NK 細胞を寛解期と比較したところ、再発時にこの NK2 偏倚は消失し、回復とともに再び出現した。このことから NK2 偏倚は MS 寛解期に特異的な所見であることが確認された。

次に NK2 偏倚の病態への影響を検討するため、NK1, NK2 細胞の存在下、非存在下で T 細胞のサイトカイン産生能を

測定した。NK2細胞存在下において、明らかにT細胞のIFN- γ 産生が抑制された。IFN- γ はMSの増悪因子として知られており、このことは寛解期MS患者のNK2偏倚が疾患抑制的に働く可能性を示唆している。さらにIL-5の中和抗体によりこの抑制が部分解除された。これはIL-5がNK2偏倚による疾患抑制効果の一部を担っていることを示している。

以上より、寛解期のMS患者末梢血NK細胞は積極的に寛解の維持に貢献している可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、多発性硬化症におけるnatural killer (NK)細胞の役割を解明することを目的とした。多発性硬化症患者の寛解期及び再発時の末梢血、及び対照群の末梢血を用いて、そのサイトカインプロファイルを定量的RT-PCR法、ELISA法を用いて検索した。さらにin vitroの系を開発して実験結果の確認を行った。その結果、患者寛解期末梢血中のNK細胞がCD95分子弱陽性で、IL-5産生性のNK2細胞に偏倚していることが明らかになった。このNK2細胞は再発時に減少し、症状の回復に従って再び寛解時のレベルまで増加した。また、自己抗原に反応するTh1細胞が多発性硬化症の病因細胞であると考えられていることに関連して、NK2細胞がTh1細胞のIFN γ 産生を抑制することを証明した。この所見は、多発性硬化症患者の寛解期におけるNK2偏倚が寛解期の維持に極めて重要な役割を果たしている可能性を示唆するものと考えられる。

以上の研究は多発性硬化症寛解期の病態の解明に貢献し、再発の予測、テーラーメイド医療における治療法選択の目安、及び新規治療標的分子の決定などに寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成14年10月23日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。