

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

山中 弘之

専攻分野：母体・胎児・新生児病態学

コース：

指導教授：鈴木 直

主論文の題目：

Interferon Regulatory Factor 7 は、Invariant Natural Killer T 細胞活性化の調節因子として作用する

共著者：

鈴木 直, 清野 研一郎

緒言

Invariant natural killer T (iNKT) 細胞は、抗原刺激を受けることで多様なサイトカインを迅速かつ大量に産生する細胞である。この iNKT 細胞の作用は、獲得免疫系を効率よく誘導するために重要な役割を果たしていることが明らかとなっているが、このメカニズムの解明には至っていない。今回我々は、interferon regulatory factor 7 (IRF7) が iNKT 細胞の活性調節に関与する可能性を見出したので報告する。

方法・対象

IRF7 欠損マウスを用いて各種検討を行った。まず、脾臓、肝臓、胸

腺中のリンパ球存在比率をフローサイトメトリーにて検証。その後 *i*NKT 細胞の機能解析を目的に、*i*NKT 細胞をセルソーターにて分取し、*in vitro* での CD3/CD28 刺激、IL-12 刺激、IFN- γ 刺激を加え、0, 6, 16, 24, 42 時間の時点で細胞を回収。RT-qPCR にて IRF7 mRNA の発現量の定量を行った。続けて *i*NKT 細胞の CD3/CD28 刺激下での IFN- γ mRNA 発現量の比較と、放射線照射(35Gy)をした J α 18 欠損マウスの脾臓細胞との共培養を行った際の IFN- γ 産生量と増殖能の比較を培養上清の ELISA、³H-thymidine 取り込み試験にて検証した。加えて *i*NKT 細胞の機能にさらに言及するため、細胞表面の CD69 と細胞内の T-bet をフローサイトメトリーで評価し、さらに *in vivo* での動向を検証するためにマウス悪性黒色腫肺転移モデルを作成し、 α -galactocylceramide (α GalCer) 投与による *i*NKT 細胞活性化による治療効果の検証を行った。統計学的検討は t 検定を用いて行った。本研究の動物実験は北海道大学で承認を受け、実施した。(承認番号: 12-0072)

結果

細胞表面抗原でリンパ球存在頻度を比較してみると、IRF7 欠損マウスでは、*i*NKT 細胞の有意な減少が認められた ($P < 0.05$)。次に、*i*NKT 細胞中の IRF7 mRNA の発現レベルの検討を行った。その結果、定常状態では plasmacytoid dendritic cell (pDC) と同レベルの mRNA を有することが明らかとなった。そこで様々な刺激を *i*NKT 細胞へ加え、様々な因子の mRNA の時間的な変化を見てみたところ、TCR 刺激 (CD3/CD28 刺激) にて刺激後早期に IRF7 mRNA の発現上昇が確認された。これが、刺激後早期のサイトカイン産生、細胞増殖に関わっていると予想し、IFN- γ に注目し、IFN- γ mRNA レベルの継時的変化、*in vitro* 培養でのサイトカイン産生量と増殖能の測定を行った。Whole splenocyte では IFN- γ タンパクの産生量はほとんど変わらないが、J α 18 欠損マウスの脾臓細胞とそれぞれの *i*NKT 細胞を共培養したところ、IRF7 欠損 *i*NKT 細胞の IFN- γ

タンパクの産生量は野生型のものを大きく超える結果となった。一方、*i*NKT 細胞自体の増殖能には差は見られなかった。この現象の具体的なメカニズムを明らかにすべく、*i*NKT 細胞で定常状態でも常に高く維持されている活性化マーカーの一つである CD69 の発現を比較したところ、IRF7 欠損 *i*NKT 細胞で優位に低下していた ($P < 0.05$)。このことから、IRF7 欠損 *i*NKT 細胞がアイドリング状態にないことを考え、この現象が *in vivo* でも同様に生じているかを明らかにするために、マウス悪性黒色腫肺転移モデルの α GalCer 投与による治療実験を行ったところ、IRF7 欠損マウスにて治療効果の減弱がみられた。さらに、ひとつ IFN- γ 産生性 *i*NKT 細胞の機能の評価を目的に、T-bet の mRNA、タンパクの測定を行ったところ、その双方が IRF7 欠損 *i*NKT 細胞で減少していた。

考察

T 細胞系への IRF7 の関与についての報告は過去にあまり報告はなく、*i*NKT 細胞に関しての詳細な解析を試みたのは、本研究が初めてである。今回差として見られた *i*NKT 細胞数の減少並びに活性化の低下に関しては、*i*NKT 細胞自体の活性化シグナル経路、主に TCR シグナル経路への関与が予想できるが、このシグナルのどこにどう関与するかの詳細を明らかにすることはできなかった。

本研究で得られた結果からは、TCR 刺激後早期の活性化への影響が示唆された。さらに、過剰な活性化を制御することにも関与している可能性が示唆されたことから、活性化、抑制に関与する共通のシグナルに IRF7 が関与しているのか、別々であるのか、その点に言及する研究の展開を検討する必要がある。また一方で、抗原提示細胞からのシグナル伝達にも IRF7 が関与している可能性も考えられたが、今回は明らかにできなかった。