

	にたはら あやの
氏 名	仁田原 綾乃
学 位	博 士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第145号
学位授与の日付	平成19年 3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	NKG2D ligation without T cell receptor engagement triggers both cytotoxicity and cytokine production in dendritic epidermal T cells (樹枝状表皮 T 細胞における NKG2D の発現と機能)
論文審査委員	主査 教授 安 保 徹 副査 教授 伊 藤 雅 章 副査 教授 内 藤 眞

博士論文の要旨

「はじめに」

活性化 NK レセプターである NKG2D はストレス・感染・癌化などにより自己の細胞上に発現誘導されるリガンドを認識する。マウスの NKG2D には、DAP10 および DAP12 アダプター分子の両者と会合できる NKG2D-S と DAP10 のみと会合する NKG2D-L という 2 つのアイソフォームが存在する。それぞれの NKG2D アイソフォームおよびアダプター分子の発現は細胞系列および活性化状態によって異なり、NKG2D レセプターからのシグナルはナイーブ NK 細胞では NKG2D-L-DAP10 経路を介して細胞障害活性を、活性化 NK 細胞ではさらに NKG2D-S-DAP12 経路を介してサイトカイン産生を直接誘導できるのに対して、DAP12 を発現しない活性化 CD8⁺T 細胞では NKG2D は共刺激レセプターとしてのみ機能する。

マウスの皮膚の上皮内リンパ球である樹枝状表皮 T 細胞 (dendritic epidermal T cell, DETC) は、junctional diversity を欠く V γ 3-J γ 1-C γ 1 鎖と V δ 1-D δ 2-J δ 2-C δ 鎖からなる多様性のない均一な $\gamma\delta$ T 細胞レセプター (T cell receptor, TCR) を発現する。DETC は TCR を介してストレスを受けた、あるいは癌化した表皮ケラチノサイト上に発現誘導されるリガンドを認識するが、V γ 3V δ 1TCR のリガンド分子自体は同定されていない。DETC は皮膚のホメオスタシスの維持・創傷治癒・皮膚腫瘍の免疫監視・炎症の制御などの機能を担っており、生体内においても DETC は周囲のケラチノサイトに生じた異常を TCR により認識して、これらの機能を発現すると考えられている。一方、DETC における TCR 以外の活性化レセプターの機能に関しては不明な点が多い。

DETC には NKG2D が発現しており、NKG2D シグナルは DETC の癌化ケラチノサイト細胞株に対する細胞傷害活性を増強することが報告されている。しかし、DETC における NKG2D アイソフォームの発現調節および NKG2D の機能の詳細は明らかにされていない。本研究では DETC における NKG2D の発現および機能について解析した。

「材料と方法および結果」

1. 正常 C57BL/6 マウスからトリプシン処理により表皮細胞浮遊液を調整し、抗 $V\gamma 3$ TCR 抗体とマグネティックビーズを用いてナイーブ DETC を単離した。活性化 DETC としては固層化抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体と IL-2 で刺激した DETC を用いた。ナイーブ DETC および活性化 DETC から抽出した RNA を用いた RT-PCR では、ナイーブ DETC と活性化 DETC の両者において NKG2D-S・NKG2D-L・DAP10・DAP12 の mRNA 発現が認められた。
2. ジギトニンで可溶化した休止期 DETC 細胞株から抗 NKG2D 抗体を用いて免疫沈降を行い、抗 DAP10 抗体および抗 DAP12 抗体で免疫プロットすることにより、NKG2D-DAP10 および NKG2D(-S)-DAP12 蛋白複合体の存在が確認された。
3. 細胞表面における NKG2D 蛋白の発現を確認するために、新鮮表皮細胞浮遊液および活性化 DETC を抗 NKG2D 抗体・抗 $V\gamma 3$ TCR 抗体・抗 CD25 抗体で染色し、フローサイトメリーにより解析した。新鮮表皮細胞浮遊液中のナイーブ DETC 上には低レベルの NKG2D の発現が認められた。無刺激の状態で一晩培養することにより DETC 上の NKG2D の発現レベルは増強したが、活性化マーカーである CD25 は陰性のままであり、NKG2D 発現の増強は活性化によるものではないと考えられた。一方、活性化 DETC 上には高レベルの NKG2D および CD25 の発現が認められた。したがって、新鮮表皮細胞浮遊液中のナイーブ DETC における NKG2D 発現の低下はトリプシン処理の影響によるものと考えられた。
4. DETC における NKG2D の機能を明らかにするために、NKG2D リガンドを発現する $V\gamma 3V\delta 1$ TCR リガンドは発現しない B 細胞リンパ腫細胞株 A20 を標的細胞とした細胞傷害性試験を行った。4 時間の共培養により休止期 DETC 細胞株は A20 細胞に対して細胞傷害活性を示し、この細胞傷害活性は抗 NKG2D 抗体の添加により部分的に阻害された。一方、抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体は DETC の A20 細胞に対する細胞傷害活性を阻害できなかった。したがって、DETC の TCR 非依存性の細胞傷害活性の一部は NKG2D からのシグナルを介していると考えられた。
5. NKG2D からのシグナルが単独で DETC のサイトカイン産生を直接誘導できるかどうかを検討するために、固層化抗 NKG2D 抗体により休止期 DETC 細胞株を刺激し、24 時間後の培養上清中の IFN- γ 濃度を測定した。DETC は固層化抗 NKG2D 抗体刺激のみで陽性コントロールである固層化抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体刺激および IL-12 + IL-18 刺激と同程度の IFN- γ を産生した。

「考察」

本研究により、DETC は NK 細胞および CD8+T 細胞とは異なり、NKG2D-S アイソフォームを構成的に発現しており、NKG2D からのシグナルはナイーブ DETC でも NKG2D-DAP10 および NKG2D-S-DAP12 経路を介して TCR 非依存性に細胞傷害活性およびサイトカイン産生を直接誘導できることが明らかになった。ヒトの表皮内にはマウスの DETC に相当する細胞は存在しないが、正常ヒト真皮内には多様性の少ない $\gamma\delta$ TCR を発現する T 細胞が存在し、これらのヒト真皮内 $\gamma\delta$ T 細胞も NKG2D を発現することが報告されている。本研究の結果はヒト真皮内 $\gamma\delta$ T 細胞においても NKG2D が活性化レセプターとして機能する可能性を示唆している。

「結論」

DETC は TCR 非依存性の活性化レセプターとして機能する NKG2D を構成的に発現しており、DETC による免疫監視において NKG2D は重要な役割を演じていると考えられる。

(論文審査の要旨)

NKG2Dは、ストレス・感染・癌化などにより自己の細胞上に発現誘導されるリガンドを認識する活性化NKレセプターである。申請者は、本研究でマウス皮膚の上皮内 $\gamma\delta$ T細胞である樹枝状表皮T細胞(dendritic epidermal T cell, DETC)におけるNKG2Dの発現および機能について解析した。

DETCにおいては未刺激の状態でもNKG2D-S・NKG2D-Lアイソフォームの両者およびDAP10・DAP12アダプター分子のmRNAの構成的な発現が認められ、免疫沈降によりNKG2D-DAP10およびNKG2D(-S)-DAP12蛋白複合体の存在が確認された。またフローサイトメトリーによりNKG2D蛋白の細胞表面での発現が確認された。DETCのB細胞リンパ腫細胞株に対する細胞傷害活性は抗T細胞レセプター抗体では阻害されず、抗NKG2D抗体により阻害された。またDETCは固層化抗NKG2D抗体刺激のみでIFN- γ を産生した。したがってDETCは他のリンパ球とは異なり、NKG2D-S-DAP12を構成的に発現しており、NKG2DレセプターシグナルはT細胞レセプターシグナル非依存性に細胞傷害活性およびサイトカイン産生を直接誘導できることが明らかになった。

以上、本論文は皮膚における免疫監視を担う上皮内 $\gamma\delta$ T細胞の新たな活性化機構を解明した点に学位論文としての価値を認める。