

氏名	上原博史
(ふりがな)	(うえはら ひろふみ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙第1190号
学位審査年月日	令和元年7月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	Mast cells regulate CD4 ⁺ T-cell differentiation in the absence of antigen presentation (肥満細胞による抗原提示を必要としない CD4 ⁺ T 細胞の分化誘導)
論文審査委員	(主) 教授 高井真司 教授 小野富三 教授 朝日通雄

学位論文内容の要旨

《背景》

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD⁺)は、古典的な補酵素であり酸化還元反応で中心的な役割を果たす。申請者らはこれまでに、NAD⁺の投与によって CD4⁺T 細胞の分化が誘導されることを示した。そして、その CD4⁺T 細胞の分化誘導は、中枢神経系の炎症性脱髄疾患モデルであるマウス EAE Model (Experimental autoimmune encephalomyelitis) において麻痺症状の予防、回復をもたらすことを示し、またマウス皮膚移植モデルでは皮膚移植片の生着延長をもたらすことを示した。

しかしながら、そのなかで CD4⁺T 細胞の分化を誘導する詳細な機構を明らかにするまでには至らなかった。今回本研究において、申請者らは抗原提示細胞(APCs)に着目した。APCs は、単に生体にとって異物である外来性抗原を貪食して除去するだけでなく、抗原を分解し、その分解産物を主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex、

MHC) class II 分子により細胞表面へ提示する機能を有する。

この APCs には、B 細胞、好中球、マクロファージ、好酸球、好塩基球、そして樹状細胞(DCs)が含まれる。そして肥満細胞(MCs)は、APCs としては典型的な細胞ではないが、アレルギーや自己免疫疾患において注目される細胞である。また近年において、MCs は自然免疫、獲得免疫の両免疫機構に作用するとの報告が散見される。その中で、*in vitro* において MCs が T 細胞に直接抗原提示をし得るという報告もなされている。しかしながら MCs が T 細胞に作用を及ぼす機構については明らかにされていない。

《目的》

抗原提示細胞(APCs)に着目し、NAD⁺が担う CD4⁺T 細胞の分化における役割を明らかにする。また、NAD⁺が誘導する CD4⁺T 細胞の分化が臨床応用される可能性について検討する。

《方法と結果》

1-1. マウスに NAD⁺を腹腔内投与し、CD4⁺T 細胞の活性化を FACS で解析した結果、CD4⁺IFN γ ⁺T 細胞、CD4⁺IL-4⁺T 細胞、CD4⁺IL-17⁺T 細胞の増加を認めた。

1-2. マウスの脾臓から得た未感作 T 細胞を T 細胞受容体 (TCR) 刺激の異なる条件で、NAD⁺存在下で培養し、ELISA、FACS で解析した結果、TCR 刺激条件下で NAD⁺が存在すれば、CD4⁺T 細胞において IFN γ 、IL-4⁺、IL-17⁺の分泌が活性化されることを示した。

以上の *in vivo*、*in vitro* 実験によって、NAD⁺投与による CD4⁺T 細胞の分化誘導には、抗原提示が必要ないことが示された。

2-1. マウスに Clodronate を静脈投与し DCs・マクロファージの除去したうえで、NAD⁺を投与し FACS で解析した結果、CD4⁺IFN γ ⁺T 細胞、CD4⁺IL-4⁺T 細胞、CD4⁺IL-17⁺T 細胞の増加を確認した。

2-2. T 細胞、B 細胞、ナチュラルキラー細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞が欠損する Rag2^{-/-} γ c^{-/-} マウスに Clodronate を静脈投与し未感作 T 細胞を細胞移植、そのうえで NAD⁺を投与し FACS で解析した結果、CD4⁺IFN γ ⁺T 細胞、CD4⁺IL-4⁺T 細胞、CD4⁺IL-17⁺T 細胞の増加を確認した。

これら実験において、NAD⁺投与による CD4⁺T 細胞の分化誘導には、抗原提示細胞としての DCs、マクロファージ、B 細胞が必要ないことが示された。

3-1. 肥満細胞の存在しない MC^{-/-}マウスに NAD⁺を腹腔内投与し、FACS で解析したが CD4⁺T 細胞の活性化は認めなかった。

3-2. マウスの大腿骨及び脛骨の骨髄から採取、培養した MCs を、未感作 CD4⁺T 細胞と共培養し TCR 刺激の異なる条件でさらにトランスウェルを用いて、細胞接触ありと細胞接触なしの群に分け比較、FACS で解析したところ、TCR 刺激、細胞間の接触の有無にかかわらず CD4⁺T 細胞は活性化した。

3-3. 健康なヒトドナーから得た未感作 CD4⁺T 細胞とヒト肥満細胞株である LAD-2 とを、マウス実験と同様の群で分け、共培養したところ、マウス実験と同様に CD4⁺T 細胞の活性化を認めた。

これらの実験より、肥満細胞存在下においては NAD⁺投与による CD4⁺T 細胞の分化誘導は、TCR 刺激に依存せずさらに CD4⁺T 細胞 - 肥満細胞間の細胞接触が必要でないことを示した。

4. *in vitro* 実験として、肥満細胞に対して LPS をポジティブコントロール群とし NAD⁺投与後に RNA シークエンス解析を行った結果、NAD⁺が肥満細胞にもたらす遺伝子変化は、LPS によってもたらされるものとは異なる特異的なものであった。

5. *in vivo* 実験として、MHC class II が欠損する MHC class II^{-/-}マウス、TCR のシグナル伝達に異常がある Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)^{-/-}マウスに対して NAD⁺を腹

腔内投与、CD4⁺T 細胞の活性化を FACS で解析した結果、これらのマウスにおいても CD4⁺IFN γ ⁺T 細胞、CD4⁺IL-4⁺T 細胞、CD4⁺IL-17⁺T 細胞の増加が確認された。

この *in vivo* 実験によって NAD⁺投与による CD4⁺T 細胞の分化誘導には、MHC class II の存在、通常の TCR のシグナル伝達が必要ないことが示された。

6. リステリア・モノサイトゲネスに感染したマウスにおいて NAD⁺が抗病原的に免疫系に及ぼす影響について検討した。致死量のリステリア・モノサイトゲネスを腹腔内に投与する、5 日前から NAD⁺を投与し、その後も継続的に NAD⁺投与を行ったマウスにおいて、生存延長を認めた。MC⁻マウスに対して同様の処置を行った群では、生存延長は認めなかった。

《考察・結論》

以上の実験によって導かれた結果は、NAD⁺の投与による CD4⁺T 細胞の分化誘導には、抗原、そしてそれを提示する B 細胞、マクロファージ、DCs は必要ではなく、MCs の存在が必要ということである。それは言い換えると、MCs は、抗原とそれを提示する細胞の存在を必要とせず NAD⁺の存在下において、単独で CD4⁺T 細胞の分化を誘導するということである。さらに、その分化誘導には MHC class II、TCR のシグナル伝達さえも必要としなかった。

この研究において申請者らは、免疫機構における古典的な免疫賦活化の経路である、APCs からの MHC class II、TCR を介した経路とは異なるこれらの経路に由らない全く新たな免疫調整を NAD⁺がもたらす可能性を示した。そしてその新たな免疫調整は、抗病原性をも有することを明らかにした。このことは、NAD⁺の投与が、感染症や、APCs から始まる MHC class II-TCR を介した通常の免疫の賦活化に異常をきたしている免疫不全患者などにとって、画期的な治療法となりえる可能性を示唆するものである。

(様式 乙9)

論文審査結果の要旨

本研究において申請者らは、NAD⁺が CD4⁺T 細胞の分化を誘導することを示し、その分化誘導には肥満細胞の存在が必要であることを明らかにしている。また、MHC class II^{-/-}、WASP^{-/-}といったノックアウトマウスを用いることによって、この分化には提示されるべき抗原だけでなく、MHC class II-TCR 間の伝達さえも必要でないことを示している。このことは本研究において申請者らが、肥満細胞が NAD⁺の存在下に導く APCs-MHC class II-TCR を介さない全く新たな免疫調整機構の存在を明らかにしたことを意味している。さらに、この NAD⁺に誘導される免疫賦活化は、マウスにおいて致死的なリステリア・モノサイトゲネ感染に対してさえ抗病原性をもたらすことを示している。

申請者らが実験に使用した MHC class II^{-/-}、WASP^{-/-}といったノックアウトマウスにおける遺伝子異常はヒトにおいても、Wiskott-Aldrich 症候群、MHC クラス II 欠損症といった複合免疫不全症を生じさせるものであり、そのなかで NAD⁺によって誘導される CD4⁺T 細胞の分化は、このような MHC class II-TCR に異常を持つ免疫不全患者に対する治療法開発の一端となる可能性がある。NAD⁺はもともと生体内に広く存在しているため、この研究が発展すればそういった遺伝子疾患のみならず、感染症やその他の免疫不全疾患に対して安全に投与できる治療薬としての臨床創薬へと発展するの可能性も十分に期待でき、臨床的意義は大きいと考えられる。

以上により、本論文は本学学位規程第3条第2項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Journal of Allergy and Clinical Immunology

142(6): 1894-1908.e7, 2018, doi: 10.1016/j.jaci.2018.01.038