

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
藤田一彦	主査 教授 花房 俊昭 副査 教授 佐野 浩一 副査 教授 清水 章 副査 教授 芝山 雄老 副査 教授 富士原 彰
主論文題名 Role of natural killer T (NKT) cells lacking interleukin (IL)-4 producing abilities on the CC-chemokine ligand 2-associated herpes simplex virus type 1 infection in human severe combined immunodeficiency (SCID) mouse chimeras (CCL2 存在下で発症するヘルペスウイルス感染症に対する IL-4 非産生性 NKT 細胞の役割)	
学位論文内容の要旨	
<p>《背景および研究目的》</p> <p>医療技術の進歩により、重度熱傷による物理的な皮膚の損傷に起因する死亡率は著しく低下した。しかしながら、これらの患者に併発する日和見感染症による死亡率は依然として高い。そしてその原因が熱傷に連動した Th2 細胞優位状態にあることが明らかにされている。つまり、重度熱傷の直後におこる全身性炎症反応症候群の代償反応として Th2 細胞優位状態が惹起されると、Th2 細胞が産生する大量の免疫抑制性 Th2 サイトカイン (IL-4 や IL-10) の作用により、生体の微生物排除システムの発動が阻止される。その為 Th2 細胞が優位状態にある熱傷患者は、健常人に比べて著しく易感染性で、病原性の低い微生物にも抵抗できず、高い頻度で感染死に至る。最近、正常 T 細胞が CC ケモカインリガンド 2 (CCL2) の刺激により Th2 細胞に変化することが明らかにされた。その際 IL-4 が必要不可欠であり、NKT 細胞が初期 IL-4 の供給細胞であることが確かめられた。本研究では、CCL2 の影響を受けた IL-4 非産生性の NKT 細胞も Th2 細胞を誘導することを見出し、日和見感染症として知られるヒト型単純ヘルペスウイルス (HSV-1) 感染症の動物モデルを用いて宿主抵抗性に果たすこれらの細胞の役割を検討した。</p> <p>《材料と方法》</p> <p>健常人およびシュライナー熱傷病院に入院中の重度熱傷患者由来の末梢血から Ficoll-Hypaque sedimentation により単核細胞を調整し、さらにプラスチック非付着性細胞画分 (リンパ球) を単核細胞画分から分離した。Whole T (CD3⁺) 細胞および CD4⁺CD45RO⁻ (naive T) 細胞は市販の分離用カラムを用いて単核細胞からそれぞれ分離した。NKT (CD3⁺CD161⁺) は whole T 細胞画分より flow cytometry により分離した。健常人および熱傷患者由来リンパ球 (2x10⁶ cells/ml) を抗 CD3 モノクローナル抗体刺激下で 48 時間培養した後、培養上清中の CCL2 量を ELISA で定量した。健常人由来リンパ球を移入した BALB/cSCID マウス (キメラ) を感染実験に用いた。キメラには非致死量 (0.2LD₅₀) の HSV-1 (KOS 株) を腹腔より感染させた。In vitro 試験では、抗 CD3 モノクローナル抗体の刺激下で、naive T 細胞と CCL2 処理 NKT 細胞を混合培養した。又必要に応じてこれらの細胞を dual-chamber の transwell で培養した。得られた細胞が Th2 細胞に変化したか否かは、その IL-4 産生能で判定した。また CCL2 投与キメラにおける Th2 細胞出現の有無は、血清中における IL-4 の</p>	

動態で判定した。血清および培養上清中の IL-4 量は ELISA にて検討した。

《結 果》

40 人の重度熱傷患者のリンパ球について、その CCL2 産生能を健常人由来リンパ球と比較すると、39 人の患者由来リンパ球で著しい(約 13 倍の)産生亢進が認められた。健常人由来リンパ球を移入されたキメラに CCL2 を皮下投与したところ、キメラの HSV-1 感染症に対する抵抗性が著しく低下し、Th2 細胞の出現が確認された。しかし、抗 161 モノクローナル抗体と補体を用いて NKT 細胞を除去した健常人由来リンパ球で作製したキメラは、CCL2 を投与されても HSV-1 感染に対して抵抗性であった。またこれらのキメラでは Th2 細胞が出現しなかった。In vitro で NKT 細胞の IL-4 産生能と Th2 細胞誘導能の関係を調べたところ、CCL2 刺激下で NKT 細胞は IL-4 を産生しないにもかかわらず、naive T 細胞を Th2 細胞に変換した。また、dual-chamber transwell 中で CCL2 刺激 NKT 細胞(upper chamber)と naive T 細胞(lower chamber)を培養すると、naive T 細胞から Th2 細胞が誘導された。

《考 察》

これまで、NKT 細胞が Th2 細胞の大量出現に関与するときは、NKT 細胞により産生された IL-4 が関与する反応であると考えられてきた。本研究を通して、CCL2 の影響を受けた IL-4 非産生性の NKT 細胞も Th2 細胞を誘導することを明らかにした。CCL2 刺激後の IL-4 非産生性の NKT 細胞が、混合培養系および transwell 培養系において等しく naive T 細胞が誘導されたことから、この反応は細胞間の接着よりむしろ液性因子の産生を介したものであらうと思われる。熱傷患者のリンパ球は大量の CCL2 を産生するので、その刺激を受けた IL-4 非産生性の NKT 細胞が大量の Th2 細胞を誘導し、熱傷患者が易感染性になることが示唆された。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第 号	氏 名	藤 田 一 彦
論文審査担当者		主 査 教 授	花 房 俊 昭
		副 査 教 授	佐 野 浩 一
		副 査 教 授	清 水 章
		副 査 教 授	芝 山 雄 老
		副 査 教 授	富 士 原 彰
主論文題名 Role of natural killer T (NKT) cells lacking interleukin (IL)-4 producing abilities on the CC-chemokine ligand 2-associated herpes simplex virus type 1 infection in human severe combined immunodeficiency (SCID) mouse chimeras (CCL2 存在下で発症するヘルペスウイルス感染症に対する IL-4 非産生性 NKT 細胞の役割)			
論文審査結果の要旨			
<p>医療技術の進歩により熱傷患者、担癌患者、術後の患者の診療は進歩しているにもかかわらず、その後発症する重篤な感染症によって死亡する患者は今も多い。そのため、感染症発症のメカニズムやその制御は重要な問題である。</p> <p>申請者は、本研究において、NKT 細胞が CCL2 存在下でのキメラ動物のヘルペスウイルス感染性に関与していることに着目し、その役割を検討して、以下の結果を得ている。</p> <ol style="list-style-type: none"> 熱傷患者由来末梢血リンパ球の培養において、健常人の約 13 倍の CCL2 の産生を認めた。 CCL2 は、健常人の末梢血を移入したキメラマウスにおいてヘルペスウイルスの病原性を高めた。 CCL2 は、キメラマウスの実験において IL-4 の産生を誘導し、NKT 細胞がその産生に関与していた。また、NKT 細胞は、CCL2 投与下でキメラマウスにおけるヘルペスウイルスの病原性を高めた。 CCL2 刺激下で、NKT 細胞は IL-4 を産生しなかった。しかし、in vitro の実験で、CCL2 存在下で naive T 細胞と NKT 細胞を混合培養すると IL-4 が産生された。 IL-4 の産生は、CCL2 で刺激を受けた NKT 細胞と naive T 細胞の培養で認められた。さらに、naive T 細胞と CCL2 で刺激された NKT 細胞を dual chamber transwells で培養したとき、naive T 細胞の培養上清にて IL-4 の産生を認めた。この実験で、CCL2 で刺激を受けた NKT 細胞が産生する未知の液性因子が IL-4 産生に必要であると示唆される。 <p>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。</p> <p>(主論文公表誌) Burns 31: 145-152, 2005</p>			