

学 位 論 文 要 旨

氏名 梅本 真吾

論 文 題 目

Mucosal immune responses associated with NKT cell activation and dendritic cell expansion by nasal administration of α -galactosylceramide in the nasopharynx.

(α -ガラクトシルセラミド経鼻投与による NKT 細胞の活性化および樹状細胞の誘導に関連した鼻咽腔粘膜免疫応答)

要 旨

ア. 緒言

病原微生物の侵入に絶えず曝されている上気道粘膜は、感染防御の第一線としてユニークかつ発達した免疫システムが存在している。一方、NKT 細胞は樹状細胞 (Dendritic cell: DC) をはじめとする免疫担当細胞と協調して宿主の免疫応答に深く関与している。

本研究では、 α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer) の経鼻投与による NKT 細胞の活性化、およびそれにより誘導される鼻咽腔粘膜免疫応答について検討した。

イ. 研究対象および方法

Specific pathogen free (SPF) 環境下で飼育された BALB/c マウス (♂、6 週齢) を使用した。

NKT 細胞のリガンドである α -GalCer を経鼻投与し、鼻粘膜 (nasal passage; NP) および鼻咽頭関連リンパ組織 (nasal-associated lymphoid tissue; NALT) を採取した。続いて α -GalCer 群と Control 群を比較して以下の検討を行った。

NALT における胚中心の形成について免疫組織学的評価を行った。NP、NALT における細胞サブセ

ットの変化および IL-17、IL-22 産生細胞についてフローサイトメトリーにて解析し、抗体産生細胞数を ELISPOT 法にて検討した。更に、nontypable *Haemophilus influenzae* (NTHi)、*Streptococcus pneumoniae* (Sp) の鼻腔からのクリアランスについて評価した。

ウ. 結果

α-GalCer 群は Control 群と比して以下の事が確認された。

- ・ NALT における胚中心の形成 (DC の活性化、誘導) が免疫染色にて確認された。
- ・ NALT において NKT 細胞および DC の増加を認めた。また成熟 DC の頻度が高い傾向が示された。
- ・ B 細胞系の変化として、免疫実行組織である NP において B2 細胞優位となる傾向にあり、抗体産生細胞の増加が示唆された。実際、抗体産生細胞数についても評価すると、NP における IgA 産生細胞の著明な増加を認めた。
- ・ NP において IL-17 産生細胞の増加を認めた。
- ・ Sp、NTHi ともに鼻腔からのクリアランスが高く、Sp に関しては、anti IL-17 にて neutralization 施行した群でクリアランスの低下を認めた。

エ. 考察と結語

経鼻ワクチンは上気道粘膜免疫防御において有効であることがこれまでも示されている。




以前の研究で我々は、抗原とともにアジュバントとして α-GalCer を経鼻投与することで、抗原特異的な免疫反応が増強する事を報告している。今回の研究では、α-GalCer のみの経鼻投与でも NKT 細胞の活性化を通じて免疫反応をプラスに調節する事を明らかにした。

また本論文は、抗原投与を行わず α-GalCer のみの経鼻投与による NKT 細胞の活性化によって Sp、NTHi の両方に対する感染予防効果が得られることを示した最初の論文である。




更に、NKT 細胞による免疫調節には、NKT 細胞と DC および Th17 細胞との間に相互作用が存在する事が示唆された。

今回の結果から、NKT 細胞は直接的に免疫担当細胞と協調し、上気道粘膜においても生体防御に重要な役割を果たしていることが示された。

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 558 号	氏名	梅本真吾
審査委員会委員		主査氏名	柴田 洋孝 
		副査氏名	山岡 吉生 
		副査氏名	波多野 豊 
<p>論文題目 Mucosal immune responses associated with NKT cell activation and dendritic cell Expansion by nasal administration of α-galactosylceramide in the nasopharynx. (α-ガラクトシルセラミド経鼻投与による NKT 細胞の活性化および樹状細胞の誘導に関連した鼻咽腔粘膜免疫応答)</p> <p>論文掲載雑誌名 Otolaryngology: Open Access</p> <p>論文要旨 病原微生物の進入に対する感染防御として、上気道粘膜は NKT 細胞、樹状細胞(Dendritic cell: DC)などの免疫担当細胞と協調して宿主の免疫応答に深く関与している。本研究では、α-ガラクトシルセラミド(α-GalCer)の経鼻投与による NKT 細胞の活性化およびそれにより誘導される鼻咽頭粘膜免疫応答について検討した。 Specific pathogen free 環境下に飼育された BALB/c マウス (雄 6 週齢) を使用し、NKT 細胞のリガンドである α-GalCer または PBS (コントロール群) を経鼻投与し、鼻粘膜(NP)および鼻咽頭関連リンパ組織(NALT)を採取した。 α-GalCer 群はコントロール群と比べて、鼻咽頭関連リンパ組織において胚中心の形成 (樹状細胞の活性化、誘導)、NKT 細胞および樹状細胞の増加を認めた。また鼻粘膜では B2 細胞優位で IgA 産生細胞の著明な増加と IL-17 産生細胞の増加を認めた。さらに、Streptococcus pneumoniae (Sp), Nontypable Haemophilus influenzae (NTHi) の鼻腔投与によるクリアランス試験を行ったところ、α-GalCer 群の方がクリアランスが高く、Sp については抗 IL-17 抗体投与によりクリアランスの低下を認めた。 経鼻ワクチンは上気道粘膜免疫防御に有効であることが示されており、抗原と同時にアジュバントとして α-GalCer を経鼻投与すると抗原特異的な免疫反応が増強することを報告している。本研究の結果、α-GalCer のみの経鼻投与でも NKT 細胞の活性化を介して免疫反応を高められることを明らかにした。さらに、NKT 細胞による免疫調節には、NKT 細胞と樹状細胞および Th17 細胞の間の相互作用が重要である可能性が示唆された。</p>			

最終試験
の結果の要旨
学力の確認

審査区分 課・論	第558号	氏名	梅本真吾
審査委員会委員		主査氏名	柴田 洋孝 
		副査氏名	山岡 吉生 
		副査氏名	波多野 豊 
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 今回、既報でもアジュバントして用いていたα-GalCerの単独の効果を検討した経緯はなぜか？ 2. 発表者らの既報論文で、α-GalCerのみのnegative controlでは鼻粘膜の抗体産生はみられていないのに本研究では認められたのはなぜか？ 3. α-GalCerを週1回、計3回投与する方法を用いているが、マウスによる個体差、用量依存性などは検討しているか？ 4. 各実験に用いているマウスの個体数の記載がないが全体でどれぐらいのマウスを用いたか？ 5. アジュバントのみで、非常に効果が見られているが、他の疾患を含めて、過去に同様に効果を認めたという報告は存在するのか？ 6. α-GalCerを0, 7, 14日目に投与し、その1週間後に効果判定を行っているが、このタイムコースはどのように定めたのか？ 7. 菌を用いた実験では10^8CFUを用いているが、なぜそのように決めたのか、他の量では行っていないのか？ 8. 有意差のデータが少なく、傾向があるというだけのデータが多いが、今後どのように改善すれば、有意差が出るデータになりうると思われるか？ 9. IL-17とIL-22の効果に差があるが、なぜか？ 10. インフルエンザ菌ではIL-22の中和効果はなく、肺炎球菌のみに見られた原因はなぜか？ 11. アジュバントのみで、細菌が完全に排除された例はあったか？ 12. Semi-quantitative PCRでは、どのようにして定量を試みたのか？ 13. CD1dはNKTに特異的に発現しているのか？ 14. 何故、Balbcを使用したのか？ 15. Th2サイトカインは何故調べなかったのか？ 16. 中和抗体の投与実験では、isotype抗体を用いたコントロール群が必要ではないか？ 17. 局所でのNKT、DCの増加が観察されているが、局所での増殖か局所への動員か？ 18. 先生方のプロジェクトの戦略における本研究の意義は？ 19. α-GalCer長期投与によるTh17賦活を介した膠原病発症などのリスクについてどう考えるか？ <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。