

# 和泉泰衛論文内容の要旨

主 論 文

## Characterization of Peripheral Natural Killer Cells in Primary Sjögren's Syndrome : Impaired NK Cell Activity and Low NK Cell Number

原発性シェーグレン症候群における末梢 NK 細胞の特徴  
: NK 活性低下と NK 細胞数減少

和泉泰衛 井田弘明 黄明国 岩永希 田中史子 荒武弘一朗 有馬和彦  
玉井慎美 蒲池誠 中村英樹 川上純 Paul Anderson 江口勝美

The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, accepted

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻  
(主任指導教員：江口勝美教授)

### 緒 言

NK 細胞は自然免疫において細胞傷害活性を有する重要な細胞であり、自己の細胞の表面に発現している MHC class I 分子の発現レベルを監視することによって、癌細胞やウイルス感染細胞を認識し、除去する事ができる。NK 細胞は MHC class I 分子の発現量が減少している標的細胞を NK レセプターで認識する。標的細胞の MHC class I 分子発現が低下していると NK 細胞中の抑制シグナルが抑制されるため、結果的に NK 細胞は活性化され、NK 細胞に含まれるパーフォリンやグランザイム B といった細胞傷害性顆粒を標的細胞内へ放出し標的細胞の細胞死を誘導する。さらに、NK 細胞は自己反応性の T 細胞や B 細胞を除去することによって免疫調節にも関与している。従って、NK 細胞数の減少や NK 細胞の機能低下によりウイルス感染の遷延化、悪性腫瘍や自己免疫疾患の発生に繋がっていることが推測される。

原発性シェーグレン症候群(以下 pSS)は dry mouth と dry eye を臨床症状の特徴としても自己免疫疾患の一つである。pSS における NK 活性の低下について多くの報告があり、NK 活性の低下が pSS における悪性リンパ腫を含むリンパ増殖性疾患の頻度増加に関係していると考えられている。今回、私たちは pSS における NK 活性低下の機序を解明するために、pSS 患者と健常者の NK 活性、NK 細胞数、NK 細胞の表面分子、血中サイトカイン等を測定し、その関連について検討した。

### 対象と方法

1. インフォームド・コンセントを得た当科膠原病外来通院中でステロイドや免疫抑制剤の服用歴のない pSS 患者(16 名)と健常者(15 名)から血液を採取し実験に使用した。
2. NK 活性は  $^{51}\text{Cr}$  release assay を用い計測した。
3. NK 細胞表面分子 (CD161, CD244, CD2, CD16, NKp46, NKp30, NKG2D) の発現は対象者からリンパ球を分離し、モノクローナル抗体を添加後、フローサイトメーターにて解析した。CD56 陽性、CD3 陰性の細胞群を NK 細胞とし、3 カラー解析を行った。
4. ELISA を用いて血清サイトカイン (IL-18, IL-15, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6) を測定した。
5. NK 細胞のアポトーシスに関して Annexin V を用いて測定した。

## 結 果

- 1) 白血球数とNK細胞のリンパ球に占める割合及びNK細胞数がpSSで有意に少なかった。
- 2) NK活性はEffector/Target比 50:1,20:1,10:1 いずれもpSSが有意に健常者より低かった。
- 3) lytic units (LU) (20%のtarget cellを殺すのに必要なNK細胞数の逆数を表すもので、値が高いほどNK活性が強いことを示す)は、pSSで有意に健常者より低かったが、NK細胞一個あたりのLUは同等であった。
- 4) NK細胞表面分子の発現はCD2, NKG2Dが有意にpSSで低下していた。各表面分子の平均蛍光強度(MFI)はNKG2DがpSSで有意に低下、NKp46はpSSで有意に上昇していた。CD3陽性細胞(T細胞)において同様の検討を行ったが、有意な差は認められなかった。
- 5) 血清中サイトカインについてはIL-18, TNF $\alpha$ がpSSで有意に上昇、IL-15, IFN $\gamma$ , IL-6では有意差が認められなかった。
- 6) pSS患者31名と健常者21名におけるNK細胞のアポトーシスについての検討では、pSSでは健常者に比較して、すでにアポトーシスを生じている細胞(Annexin V陽性)の割合が健常者に比較して多かった。T細胞では有意な差は認められなかった。

## 考 察

古くからウイルス感染者、自己免疫疾患患者末梢血中のNK細胞数の減少と活性の低下が報告されている。私たちも、自己免疫疾患患者末梢血中のNK細胞数を検討したが、健常者に比べてNK細胞数は低下していた。その数の減少と機能低下が、自己反応性T細胞やB細胞を増加させ、自己免疫疾患を発症・増悪させている可能性がある。私たちはこれまで、健常者末梢血リンパ球からネガティブセレクションで分離したNK細胞を使用して、細胞表面抗原刺激(CD2, CD16, CD94)およびサイトカイン刺激(IL-15, IL-12+IL-15, IL-12+IL-18, IL-15+IL-18, TNF $\alpha$ )にてNK細胞自身にアポトーシスが誘導されることを報告してきた。

本研究において、pSS患者のNK細胞は、末梢ですでに多くの細胞がアポトーシスを生じており、血清中のIL-18やTNF $\alpha$ が増加していることから、これらのサイトカイン刺激などアポトーシスを誘導する機転が働き、その結果NK細胞数が減少していると推測された。pSS患者と健常者では、1個のNK細胞あたりのNK活性(LU)は差が無く、pSS患者のNK活性低下は、NK細胞数低下に起因していると考えられた。NK細胞表面分子の検討では、pSS患者のNK細胞は、健常者に比べて、活性化分子であるCD2やNKG2D分子の発現が低下していたが、CD3 $\alpha$ 鎖と会合し、細胞傷害性を増強させるNKp46分子のMFIは逆に増加していた。これらのNK細胞を活性化させるシグナル伝達に関係する表面分子は、お互いの発現を補いあうことによって、結果的には、1個あたりのNK細胞の力を減弱させないような機転が働いている可能性が示唆された。

pSSでは悪性リンパ腫を含むリンパ増殖性疾患の合併の頻度が多いが、その原因としてNK活性低下が考えられている。私たちの研究結果から、pSSにおいてはNK細胞が恐らくアポトーシスにより細胞数が減少し、NK活性の低下が起こっていることが示唆された。