

| | |
|----------|--|
| 氏名 | つね みね ひろ こ 常 峰 紘 子 |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (医 学) |
| 学位記番号 | 医 博 第 2994 号 |
| 学位授与の日付 | 平成 18 年 3 月 23 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 |
| 研究科・専攻 | 医学研究科内科系専攻 |
| 学位論文題目 | LPS-induced ROS generation and changes in glutathione level and their relation to the maturation of human monocyte-derived dendritic cells (ヒト単球由来樹状細胞における LPS 誘導成熟化機序の解明——活性酸素産生とグルタチオンレベルの解析——) |
| 論文調査委員 | (主 査) 教授 杉田昌彦 教授 三森経世 教授 三嶋理晃 |

論 文 内 容 の 要 旨

細胞内活性酸素 (ROS) や細胞内酸化還元状態の変化は、細胞の活性化や生死などを修飾することが報告されている。一方免疫学分野では樹状細胞 (DC) の重要性が明らかにされ、臨床的解析・応用へと展開されつつある。最近この DC において、細胞内 ROS 産生や酸化還元状態を修飾することにより、その機能を制御し得るとの報告がなされている。本研究ではこの点に注目し、ヒト単球を培養して得た樹状細胞を用いてリポ多糖体 (LPS) 刺激による細胞内 ROS 産生、酸化型グルタチオン (GSSG) に対する還元型 (GSH) の割合 (GSH/GSSG) の変化、そしてこれらが DC の成熟に関わる諸機能 (サイトカイン産生、表面分子発現の変化、allo T 細胞増殖刺激作用) に及ぼす作用を検討した。

ROS 全般を検出する蛍光物質 Red CC-1 を用いて共焦点顕微鏡で検討した結果、LPS 刺激4時間後の未熟 DC 内で蛍光強度の上昇を観察し、フリーラジカル消去剤である PBN (α -phenyl-tert-butyl nitron) の添加によりこの上昇は減弱した。この結果より LPS 刺激にて DC 内では ROS 産生が起こることを確認した。また ROS 産生は還元型グルタチオンエステル GSH-OEt (glutathione monoethyl ester) の前処理により減弱する成績を得た。産生された活性酸素種を同定するため電子スピン共鳴法解析で解析した結果、過酸化水素 (H_2O_2) のシグナルを検出し、このシグナルは PBN の前処理により減弱したことから H_2O_2 の上流で産生されるスーパーオキシド (O_2^-) と考えられた。次に GSH/GSSG を測定解析した。LPS 刺激4時間後の未熟 DC 内で GSH/GSSG の低下が認められた。この低下は PBN による前処理では不変であったが、GSH-OEt の前処理では抑制された。以上より LPS は DC 内に存在する NADPH oxidase を活性化することにより、NADPH を $NADP^+$ に変換し、 O_2 に電子を供与して O_2^- を産生するとともに細胞内グルタチオンを還元型から酸化型に変換すると考えられた。

LPS 刺激により48時間後には DC は成熟し、炎症性サイトカインである Interleukin-12, $TNF-\alpha$ を有意に産生し、細胞表面分子の HLA-DR, CD40, CD80, CD86, CD83 等の発現を増強した。また allo T 細胞増殖刺激作用を認めた。PBN の前処理では上記のサイトカイン産生能のみが抑制され、GSH-OEt 処理では上記全ての作用が抑制されたことから、LPS 刺激を加えたヒト単球由来 DC において、細胞内酸化還元状態の変化はサイトカイン産生、細胞表面分子の発現、T 細胞増殖刺激能すべてに関与し、細胞内 ROS 産生はサイトカイン産生のみに関与することが示唆された。

本研究では、ヒト単球由来 DC において LPS 刺激により細胞内で ROS 産生が起こること、GSH/GSSG が低下することを確認した。さらに ROS 産生のみを抑制するとサイトカイン産生が低下し、ROS 産生と GSH/GSSG の変化を抑制すると表面マーカーの発現増強並びに T 細胞増殖刺激作用も減弱する成績を得た。以上の結果より、LPS は ROS 産生や GSH/GSSG の変化により DC 機能を修飾することが示唆された。

以上は LPS が深く関わる敗血症などの病態解明や治療に関する有用な所見になり得ると考えた。

論文審査の結果の要旨

細胞内で産生される活性酸素（ROS）や細胞内酸化還元状態の変化は、細胞の活性化や生死などを修飾することが報告されている。最近、樹状細胞（DC）においても、細胞内の ROS 産生や酸化還元状態を修飾することで、その機能を制御し得るとの報告がある。そこで本研究では、ヒト単球由来 DC を用いてリポ多糖体（LPS）刺激による細胞内 ROS 産生、酸化型グルタチオン（GSSG）に対する還元型（GSH）の比（GSH/GSSG）の変化、そしてこれらが DC の成熟に関わる諸機能（サイトカイン産生、表面分子発現の変化、alloT 細胞増殖刺激作用）に及ぼす作用を検討した。

最初に LPS 刺激により細胞内で ROS 産生が起こること、GSH/GSSG が低下することを確認した。さらに LPS 刺激時に ROS 産生を抑制する PBN を加えると、サイトカイン産生が低下し、ROS 産生と GSH/GSSG の変化を抑制する GSH-OEt を加えると、表面マーカーの発現増強並びに T 細胞増殖刺激作用も減弱する成績を得た。以上の結果より、LPS 刺激を加えたヒト単球由来 DC において細胞内 ROS 産生はサイトカイン産生のみに関与し、細胞内酸化還元状態の変化はサイトカイン産生に加えて細胞表面分子の発現、T 細胞増殖刺激能にも関与することが示唆された。

本研究は、活性酸素ならびに細胞内酸化還元状態の変化と樹状細胞機能との関係の解明に貢献し、LPS が深く関わる敗血症などの病態解明や治療に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は平成18年3月1日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。