

| | |
|----------|--------------------------------------|
| 氏名 | おがわ よし ゆき 小川 芳之 |
| 学位(専攻分野) | 博士(薬学) |
| 学位記番号 | 薬博第599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 | 薬学研究科医療薬科学専攻 |
| 学位論文題目 | 全身性エリテマトーデスモデルマウスにおける DNA 処理特性に関する研究 |

論文調査委員 (主査) 教授 高倉喜信 教授 橋田 充 教授 乾 賢一

論文内容の要旨

全身性エリテマトーデス (SLE) は発症と前後して抗 DNA 抗体が増加していく典型的な自己免疫疾患の一つであり、抗 DNA 抗体が自己由来の DNA と複合体を形成して血中 DNA 濃度を上昇させると共に、種々の組織に沈着し様々な障害を引き起こすことが知られている。SLE 発症の原因には未だ不明な点が多いが、一部の SLE 患者および SLE モデルマウスにおいて血中の DNase 活性が低下していること、また DNase I ノックアウトマウスが SLE 様症状を発現することから、DNA 処理機構の異常が SLE 発症に関与しているものと推察されている。著者の所属する研究室ではこれまでにプラスミド DNA (pDNA) のマウス体内動態に関する検討を行い、肝臓の Kupffer 細胞に代表されるマクロファージ系の細胞が pDNA の取り込みに大きく関与することを明らかにすると共に、腹腔マクロファージを用いて細胞活性化に関する検討を行い、DNA をカチオン性リポソームとの複合体とすることで CpG モチーフが豊富に存在する細菌由来の DNA のみならず CpG モチーフを僅かしか含まない哺乳類由来の DNA を用いた場合でも活性化が誘導されることを見出している。そこで本研究では SLE 発症の原因解明を目的として、SLE モデルマウスにおける DNA 処理特性を全身および細胞レベルで検討すると共に、SLE モデルマウスの抗原提示細胞において DNA の取り込みにより惹起される免疫反応に関して検討した。

I. SLE モデルマウスにおける DNA の体内動態に関する検討

全身レベルでの DNA 処理特性と SLE との関連を検討する目的で、SLE を自然発症するモデルマウスである NZB×NZW F₁ (NZB/W) マウスを用いて pDNA を尾静脈より投与した場合の体内動態を評価した。SLE を発症していない若年期の NZB/W マウスを用いて検討したところ、pDNA は血中から速やかに消失し主に肝臓に取り込まれ、対照として用いた ICR マウスでの体内動態と顕著な違いは認められなかったが、血中からの消失に若干の遅延傾向が認められた。加齢により SLE 病態を発症した NZB/W マウスと同週齢の ICR マウスを用いて検討を行なった場合にも同様の結果が得られた。また種々の系統のマウスの血漿中 DNase I 活性を測定し NZB/W マウスと比較したところ、有意な差は認められなかった。以上の結果より、NZB/W マウスにおける全身レベルでの DNA 処理特性は健常マウスと顕著な違いはないものの、血中からの DNA の消失が遅延している可能性が示された。

II. マクロファージおよび樹状細胞における DNA 取り込み特性に関する検討

生体内において DNA は主にアポトーシスによる細胞死の過程で出現し、周囲に存在するマクロファージ等の貪食細胞により処理されることが知られている。そこで NZB/W マウスより腹腔マクロファージを採取し、pDNA の細胞内取り込みおよび分解を評価した。その結果、NZB/W マウスのマクロファージは ICR マウスから採取したマクロファージに比べ有意に低い pDNA 取り込みを示すことが明らかになった。また SLE 病態を発症した NZB/W マウスのマクロファージにおいては pDNA の取り込みと共に、細胞表面への pDNA 結合も有意に低下していることが明らかになった。DNase 前処理により pDNA 結合量は対照レベルに回復したことから、内因性の DNA が pDNA の結合を競合的に阻害していることが示唆された。また NZB/W マウスの樹状細胞においてもマクロファージと同様の pDNA 取り込みの低下が認められた。以上

の結果より、NZB/W マウスにおいてはマクロファージおよび樹状細胞における細胞レベルでの DNA 処理が遅延している可能性が示された。

一方、マクロファージは死細胞を取り込むことで活性化し、周囲の炎症反応に影響を与えることが知られている。そこでグラム陰性菌の細胞壁構成成分であるリポ多糖 (LPS) によるマクロファージの活性化状態が DNA 取り込みに与える影響を検討した。その結果、LPS を用いて活性化することでマクロファージ細胞株 RAW 細胞および腹腔マクロファージにおける pDNA 取り込み量が有意に増加することが明らかになった。また NZB/W マウスの腹腔マクロファージにおいても活性化による pDNA の取り込みの上昇が認められた。

Ⅲ. SLE モデルマウスのマクロファージの活性化に関する検討

DNA は SLE における最も重要な自己抗原であり、抗 DNA 抗体の産生には T 細胞が必須であることが知られている。したがって DNA 処理に伴うマクロファージ等の抗原提示細胞の活性化は抗 DNA 抗体の産生に重大な影響を与えるものと考えられる。そこで各種炎症性サイトカインの産生を指標に DNA およびカチオン性リポソーム複合体による活性化を NZB/W マウスのマクロファージを用いて検討した。その結果、NZB/W マウスのマクロファージにおいても ICR マウスのマクロファージの場合と同様に DNA を単独で加えた場合は活性化されず、カチオン性リポソーム複合体を加えた場合にのみ活性化されることが明らかになった。さらに NZB/W マウスのマクロファージは対照のマクロファージと比較してインターロイキン-6 を過剰に産生する一方で腫瘍壊死因子- α の産生は逆に低下していることを見出した。以上の結果より、NZB/W マウスの抗原提示細胞は DNA に対して特徴的な反応を示すことが明らかとなり、SLE 病態と関連する可能性が示唆された。

以上、本研究では、NZB/W マウスにおける全身および細胞レベルでの DNA 処理の特性を明らかにすると共に、DNA 取り込みにより免疫担当細胞が特徴的な活性化反応を示すことを見出した。マクロファージにおける DNA 取り込みの低下は DNA の血中滞留性の上昇および周辺の細胞への DNA の移行につながり、DNA の抗原性を増大させているものと推察される。これらの知見は、SLE の原因の解明に対し有用な基礎情報となるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

全身性エリテマトーデス (SLE) は発症と前後して抗 DNA 抗体が増加していく典型的な自己免疫疾患の一つであり、抗 DNA 抗体が自己由来の DNA と複合体を形成して血中 DNA 濃度を上昇させると共に、種々の組織に沈着し様々な障害を引き起こすことが知られている。SLE 発症の原因には未だ不明な点が多いが、一部の SLE 患者および SLE モデルマウスにおいて血中の DNase 活性が低下していること、また DNase I ノックアウトマウスが SLE 様症状を発現することから、DNA 処理機構の異常が SLE 発症に関与しているものと推察されている。著者の所属する研究室ではこれまでにプラスミド DNA (pDNA) のマウス体内動態に関する検討を行い、肝臓の Kupffer 細胞に代表されるマクロファージ系の細胞が pDNA の取り込みに大きく関与することを明らかにすると共に、腹腔マクロファージを用いて細胞活性化に関する検討を行い、DNA をカチオン性リポソームとの複合体とすることで CpG モチーフが豊富に存在する細菌由来の DNA のみならず CpG モチーフを僅かしか含まない哺乳類由来の DNA を用いた場合でも活性化が誘導されることを見出している。そこで本研究では SLE 発症の原因解明を目的として、SLE モデルマウスにおける DNA 処理特性を全身および細胞レベルで検討すると共に、SLE モデルマウスの抗原提示細胞において DNA の取り込みにより惹起される免疫反応に関して検討した。

全身レベルでの DNA 処理特性と SLE との関連を検討する目的で、SLE を自然発症するモデルマウスである NZB \times NZWF₁ (NZB/W) マウスを用いて pDNA を尾静脈より投与した場合の体内動態を評価した。SLE を発症していない若年期の NZB/W マウスを用いて検討したところ、pDNA は血中から速やかに消失し主に肝臓に取り込まれ、対照として用いた ICR マウスでの体内動態と顕著な違いは認められなかったが、血中からの消失に若干の遅延傾向が認められた。加齢により SLE 病態を発症した NZB/W マウスと同週齢の ICR マウスを用いて検討を行なった場合にも同様の結果が得られた。また種々の系統のマウスの血漿中 DNase I 活性を測定し NZB/W マウスと比較したところ、有意な差は認められなかった。以上の結果より、NZB/W マウスにおける全身レベルでの DNA 処理特性は健常マウスと顕著な違いはないものの、血中からの DNA の消失が遅延している可能性が示された。

生体内において DNA は主にアポトーシスによる細胞死の過程で出現し、周囲に存在するマクロファージ等の貪食細胞により処理されることが知られている。そこで NZB/W マウスより腹腔マクロファージを採取し、pDNA の細胞内取り込みおよび分解を評価した。その結果、NZB/W マウスのマクロファージは ICR マウスから採取したマクロファージに比べ有意に低い pDNA 取り込みを示すことが明らかになった。また SLE 病態を発症した NZB/W マウスのマクロファージにおいては pDNA の取り込みと共に、細胞表面への pDNA 結合も有意に低下していることが明らかになった。DNase 前処理により pDNA 結合量は対照レベルに回復したことから、内因性の DNA が pDNA の結合を競合的に阻害していることが示唆された。また NZB/W マウスの樹状細胞においてもマクロファージと同様の pDNA 取り込みの低下が認められた。以上の結果より、NZB/W マウスにおいてはマクロファージおよび樹状細胞における細胞レベルでの DNA 処理が遅延している可能性が示された。

一方、マクロファージは死細胞を取り込むことで活性化し、周囲の炎症反応に影響を与えることが知られている。そこでグラム陰性菌の細胞壁構成成分であるリポ多糖 (LPS) によるマクロファージの活性化状態が DNA 取り込みに与える影響を検討した。その結果、LPS を用いて活性化することでマクロファージ細胞株 RAW 細胞および腹腔マクロファージにおける pDNA 取り込み量が有意に増加することが明らかになった。また NZB/W マウスの腹腔マクロファージにおいても活性化による pDNA の取り込みの上昇が認められた。

DNA は SLE における最も重要な自己抗原であり、抗 DNA 抗体の産生には T 細胞が必須であることが知られている。したがって DNA 処理に伴うマクロファージ等の抗原提示細胞の活性化は抗 DNA 抗体の産生に重大な影響を与えるものと考えられる。そこで各種炎症性サイトカインの産生を指標に DNA およびカチオン性リポソーム複合体による活性化を NZB/W マウスのマクロファージを用いて検討した。その結果、NZB/W マウスのマクロファージにおいても ICR マウスのマクロファージの場合と同様に DNA を単独で加えた場合は活性化されず、カチオン性リポソーム複合体を加えた場合のみ活性化されることが明らかになった。さらに NZB/W マウスのマクロファージは対照のマクロファージに比較してインターロイキン-6 を過剰に産生する一方で腫瘍壊死因子- α の産生は逆に低下していることを見出した。以上の結果より、NZB/W マウスの抗原提示細胞は DNA に対して特徴的な反応を示すことが明らかとなり、SLE 病態と関連する可能性が示唆された。

以上、本研究では、NZB/W マウスにおける全身および細胞レベルでの DNA 処理の特性を明らかにすると共に、DNA 取り込みにより免疫担当細胞が特徴的な活性化反応を示すことを見出した。マクロファージにおける DNA 取り込みの低下は DNA の血中滞留性の上昇および周辺の細胞への DNA の移行につながり、DNA の抗原性を増大させているものと推察される。これらの知見は SLE の原因の解明に対し有用な基礎情報となるものと考えられる。

よって、本論文は博士 (薬学) の論文として価値あるものとする。

更に、平成18年3月2日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。