

氏名	よしむらさとみち通
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	論薬博第671号
学位授与の日付	平成14年5月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	樹状細胞におけるNF- κ Bの役割に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授市川厚 教授川寄敏祐 教授河合明彦

論文内容の要旨

樹状(以下DCと略す)細胞は、最も強い抗原提示能を持つ免疫担当細胞であり、DC細胞のみがNaïve-T細胞を直接活性化できる。近年、慢性関節リウマチをはじめとする種々の疾患においてDC細胞の機能異常が示唆されており、DC細胞をターゲットとした研究が注目を集めている。筆者はDC細胞の重要な機能の一つである抗原提示におけるNF- κ Bの役割を明らかにする事を目的として研究を行った。以下、本研究の成績について述べる。

1) DC細胞の培養法の確立と抗原提示におけるNF- κ Bの役割の解明。

従来、安定的に純度の高いDC細胞を大量に得る事は難しかった。筆者はヒト免疫グロブリンを結合させた培養プレート上でモノサイトを培養して得られる上清を用いる事により、DC細胞の分化が著しく促進される事を見出した。さらに前駆細胞の濃縮を目的としてElutriation法を組み合わせる事で、最終的に得られるDC細胞の純度を飛躍的に上昇させる事に成功した(純度95%)。筆者の調整したDC細胞は、Class II, CD83, CD86抗原等を高発現しており、DC細胞の特色を示した。さらに、DC細胞の生物活性評価法としてアロ混合リンパ球反応(Allo-MLR)を検討したところ、DC細胞の特徴であるアロリンパ球の増殖促進作用を示した。次に、NF- κ Bの活性を特異的に制御する方法として、天然阻害分子であるI κ B遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター(AdvI κ B)を用い目的とする細胞にI κ Bを過剰に発現させる系を構築した。DC細胞は、強くアロリンパ球の増殖を促進したが、MLRの前にI κ B-ウイルスに感染させたDC細胞(AdvI κ B-DC細胞と略す)の場合には完全にこの増殖促進作用は消失した。次に、作用機序の解明を試みた。表面抗原において、AdvI κ B-DC細胞は抗原提示に重要とされているClass II分子やCD86分子の発現が著しく抑制されていた。またサイトカインの産生については、TNFやIL-12の産生が阻害される事が明らかとなった。以上の事から、AdvI κ B-DC細胞において認められた抗原提示能の消失に対する機序としてClass II分子やco-stimulator分子の発現抑制および特定のサイトカイン産生阻害が深く関与している事が考えられた。

2) NF- κ Bの活性を阻害する事によるDC細胞の機能調節。

NF- κ Bの活性を特異的に制御する別の方法として、I κ B分子の分解酵素に対する阻害薬(PSI)を利用した。ウイルスベクターを用いた場合と同様の系で実験を行い、PSI処理によっても同じ作用機序によりAllo-MLR反応の著しい抑制が誘導される事を証明した。この結果から、ウイルスベクターを用いた場合に認められた現象がウイルス感染による二次的な反応ではなく、I κ Bを介したNF- κ Bの特異的阻害に起因する事が判明した。次に、NF- κ Bの活性を阻害したDC細胞と共培養されたアロリンパ球に対し、種々の刺激を加えた時のT細胞サイトカインの産生を調べたところ、まったく認められない事から、アロリンパ球がアナジー様の不応答になっている可能性が考えられた。そこで、NF- κ Bの活性を阻害したDC細胞とアロリンパ球を前培養した後、アフィニティープレートによりDC細胞のみを除いた。次いで正常DC細胞とAllo-MLRを行ったが、予想通りアロリンパ球の増殖は回復しなかった。その作用機序を検討し、アロリンパ球のIL-2レセプターの発現減少とIL-2の産生抑制が関与している事を合わせて証明した。以上の事は、NF- κ Bの活性を阻害されたDC細胞が単に抗原提示能を消失しているのみではなく、積極的にアロリンパ球をアナジーに導くシグナルを伝達している

事を示唆している。

3) *in vivo* における, NF- κ B の抑制を介した DC 細胞の機能調節。

マウスの遅延型過敏症 (DTH) 反応を用いて T 細胞活性化に及ぼす DC 細胞の作用を検討した。あらかじめコントロールウイルスあるいは I κ B-ウイルスに感染させた DC 細胞をそれぞれマウスの腹腔に免疫し, 2 週間飼育した。次いで, 足蹠皮内に DC 細胞を接種し, 経時的に足蹠の腫れを測定した。I κ B-ウイルスに感染させた DC 細胞を投与した群では, DTH 反応出現時間が遅延し, また反応の程度も軽い事が明らかとなった。以上の事は, DC 細胞を用いた臨床応用研究において新しい可能性を示している。

筆者は, 純度の高い DC 細胞を安定的に得る方法を考案し, その細胞を用いて DC 細胞の抗原提示における NF- κ B の関与をはじめて証明した。本研究により, DC 細胞の活性化における NF- κ B の役割が明らかになり, DC 細胞調節機構の疾患治療への応用が示唆された。また, DC 細胞によりアロリンパ球がアナジーに導かれる現象は, 移植免疫においても重要な知見を提供する結果であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本論文は, 免疫担当細胞として最も強い抗原提示能を持つ樹状細胞に着目し, 抗原提示反応における NF- κ B の役割を明らかにしたものである。

著者は, まず実験に用いる樹状細胞の調製法を検討し, エルトリエーション法で濃縮した樹状細胞の前駆細胞を, ヒト免疫グロブリンを結合した培養プレート上でモノサイトを培養して得られる上清を用いて培養することにより, 95%以上の高純度で樹状細胞を大量に得る方法を確立した。次に, この樹状細胞を用いて NF- κ B が生物活性の発現を制御する因子であることを次の2方法により明らかにした。一つは, NF- κ B の特異的阻害分子である I κ B 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターにより I κ B を過剰に発現させた樹状細胞におけるアロ混合リンパ球反応を測定する方法であり, この実験で I κ B を過剰に発現した樹状細胞はアロリンパ球増殖促進作用を消失していることを見出した。さらに, この阻害メカニズムが I κ B による Class II 分子と CD86 分子の発現の抑制にあることも明らかにした。もう一つは, I κ B の分解酵素阻害薬のプロテオソームインヒビター (PSJ) を用いて I κ B の細胞内濃度を高めた樹状細胞のアロ混合リンパ球反応を検討する方法であり, この実験により PSJ で処理した樹状細胞はアロリンパ球増殖促進作用を消失していることを見出した。これらの結果から, 著者は, 樹状細胞の生物活性は NF- κ B により制御されていると結論づけ, さらに, 樹状細胞と共培養されたアロリンパ球がアナジー様の不応答になっていることを観察し, そのメカニズムはアロリンパ球の IL-2 レセプターの発現減少と IL-2 の産生抑制にあることを明らかにした。

著者はまた, マウスの遅延過敏症 (DTH) 反応を用いて T 細胞活性化におよぼす樹状細胞における NF- κ B の生物作用が *in vivo* で認められるかどうかを検討した。その結果, I κ B ウイルスを感染させ, NF- κ B の発現を高めた樹状細胞でマウスの DTH 組織部位を処理することにより DTH の発症が強く抑制されることを見出し, 樹状細胞を用いた臨床応用の可能性が示唆された。

以上, 著者は, 高純度の樹状細胞を調製する方法を考案し, その細胞を用いて樹状細胞の抗原提示における NF- κ B の関与を初めて証明した。さらに, DTH の治療における樹状細胞の臨床応用での有効性を示唆するとともに, 樹状細胞によりアロリンパ球がアナジー様の不応答に導かれるとの観察から, 移植免疫における樹状細胞の臨床応用の可能性もあわせて示唆した。よって, 本論文は博士 (薬学) の論文として価値あるものと認める。

さらに, 平成14年4月11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。