

樹状細胞の機能を制御する細胞内情報伝達機構の解析

学位論文内容の要旨

【序論】

樹状細胞 (dendritic cells, DC) は、最も強い抗原提示能を有するプロフェッショナル抗原提示細胞である。実際、DC のみが未感作のナイーブ T 細胞を活性化することができる。DC の抗原提示機構は、成熟分化に伴って巧妙に調節されている。病原体などの抗原は、DC 内で処理され、ペプチドとなって主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 分子とともに T 細胞に提示される。DC は抗原提示と同時にサイトカインや共刺激分子を介して T 細胞の活性化や分化誘導を制御し、その後の免疫応答全体を調節していると考えられている。したがって、DC は生体防御反応の始動および制御に非常に重要な役割を果たしている。

本研究では、DC における MHC 分子 や共刺激分子群 (CD80, CD86 や CD40 など) の発現調節ならびにケモカインによって誘導される抗原取り込みや細胞走化性の制御に関与する細胞内情報伝達機構を解析し、新しい知見が得られたので以下に記述する。

【結果と考察】

1) 樹状細胞における CD40 発現の選択的制御¹⁾

DC の CD40 の発現量を調節する詳細なメカニズムに関しては、現在まで不明である。また、細胞内酸化還元反応 (redox) が TNF や LPS 刺激後のシグナル伝達経路に関与していると報告されているが、redox 制御機構が DC 上の MHC や共刺激分子の発現にどのように関わっているか明らかになっていない。そこで本研究では TNF- α によって誘導される DC の成熟過程において、MHC 分子や共刺激分子の発現量に、抗酸化物質である N-acetyl-L-cysteine (NAC) や glutathione (GSH) がどのような影響を与えるか調べた。マウス DC line (BC1)、または脾臓由来 DC の成熟を TNF- α で誘導する際に NAC または GSH を共存させると、CD40 の発現量は完全に抑制された。一方、CD86, CD80 発現はわずかに抑制が、MHC 分子に関してはほとんど影響が認められなかった。これらの結果から、マウス DC において、NAC や GSH は CD40 発現を選択的に抑制することが明らかになった。

これまでに TNF- α 刺激による ERK の活性化が DC の分化や機能を負に制御すること²⁾ や、接触過敏症を誘導する化合物、2,4-dinitrochlorobenzene は、TNF- α (15 分で活性化) と異なり、添加後 3 時間から p38 MAPK の活性化を誘導し、異なる作用機構によって DC の成熟を誘導する³⁾ などを明らかにしてきた。したがって、Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) などのシグナル伝達経路は、樹状細胞の成熟過程や機能に大きく関与していると考えられた。しかし、NAC は、TNF- α によって誘導される MAPKs の活性化には影響しなかった。そこで、TNF- α によって誘導される CD40 mRNA の発現量増加に対する NAC の影響を調べた。NAC は TNF- α によって誘導される CD40 mRNA の発現量に影響を示さなかった。したがって、DC において CD40 の発現に選択的な転写後調節機構が存在すると考えられた。

以上の結果から、DC の CD40 発現に選択的な転写後調節機構が存在し、NAC や GSH などの reducing supplier はこれらの調節機構を介して CD40 発現量を選択的かつ可逆的に制御していると考えられた。したがって、二次リンパ組織など生体内においても、GSH などによる redox condition の変化が DC 上の CD40 発現量を調節し、さらにその後の T 細胞の活性化や分化に影響を与えると考えられる。

2) CCR7 リガンドによって誘導される成熟 DC の抗原取り込み能増加と細胞走化性亢進に関与する細胞内情報伝達

機構の解析

ケモカインは細胞の走化性を誘導するサイトカインとして知られており、その中でも CCR7 のリガンドである CCL19 や CCL21 は、リンパ節や脾臓に高頻度で発現している。最近、CCR7 リガンドは、細胞走化性だけでなく、これまで未成熟 DC にしか認められなかった抗原取り込み能亢進など多様な機能を誘導することが報告された。つまりケモカインは成熟 DC において抗原取り込み能と細胞走化性という2つの異なる機能を誘導し、これらの2つの機能を制御する細胞内情報伝達経路が存在することが示唆された。

これまで CCR7 リガンドによる抗原取り込み能増強には、Rho, Rac, Cdc42 などの Rho small GTPase 蛋白の中でも、Rac と Cdc42 が関与することが示唆されている。そこで、Fluorescein isothiocyanate で標識したデキストラン (FITC-Dex) を用い、成熟 DC のエンドサイトーシス(抗原取り込み)と細胞走化性に対する CCL19 と CCL21 の影響を調べた。CCL19 は成熟 DC による FITC-Dex の取り込みを濃度依存的に、また添加後数分以内に著しく増加させた。一方で CCL19 は成熟 DC による細胞走化性を濃度依存的に増強したが、この増強は CCL19 添加後 30 分以降に認められた (図 4)。

CCL19 で刺激した成熟 DC において、抗原取り込み能や細胞走化性亢進と MAPK や PI-3 kinase 活性の関係については明らかになっていない。そこで、CCR7 リガンドによって誘導される抗原取り込み能と細胞走化性亢進が各種 MAPK や PI-3 kinase の特異的阻害剤によってどのような影響を受けるか検討した。その結果、抗原取り込み能に対するこれらの特異的阻害剤の効果はほとんど認められないことが判明した。一方、細胞走化性に関しては、JNK の特異的阻害剤 (SP600125) によって、著しく抑制された。JNK 活性は CCL19 添加後 15 分で誘導され、この活性化は SP600125 によって抑制されることが確認された。これらの結果から、CCR7 リガンドによる抗原取り込み能の誘導には JNK は関与せず、細胞走化性の誘導に JNK が関与していることが初めて明らかになった。T 細胞においては、CCR7 リガンドによって誘導される細胞走化性には、Rho-associated kinase の関与が示唆されている。今回成熟 DC において Rho-associated kinase の役割を解析したが、CCL19 によって誘導される細胞走化性は、Rho-associated kinase の特異的阻害剤である Y-27632 処理によって著しく抑制された。したがって、CCR7 リガンドによる DC 走化性の誘導には、JNK 経路と Rho-associated kinase 経路が重要であることが示唆された。さらにこれら二つの誘導経路の関連性を明らかにするため、CCL19 によって誘導される JNK の活性化に対する Y-27632 の影響について検討した。その結果、JNK の活性化は、Y-27632 処理によってほとんど影響を受けず、さらに細胞走化性の抑制は SP600125 と Y-27632 を同時処理によりそれぞれの単独処理と比べて著しく増強した。したがって、CCR7 リガンドによる細胞走化性の誘導には、JNK 経路と Rho-associated kinase 経路の独立した2つの経路が必須であることが示された。

【参考文献】

1. Iijima N, Yanagawa Y, Iwabuchi K, Onoé K. (2003) *Immunology* 110:197-205.
2. Yanagawa Y, Iijima N, Iwabuchi K, Onoé K. (2002) *J. Leukoc. Biol.* 71:75-80.
3. Iijima N, Yanagawa Y, Onoé K. (2003) *Immunology* 110: 322-328..

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 田 正
副 査 教 授 五十嵐 靖 之
副 査 助 教 授 高 橋 和 彦
副 査 助 教 授 井ノ口 仁 一

学 位 論 文 題 名

樹状細胞の機能を制御する細胞内情報伝達機構の解析

平成15年12月17日に当該申請者に対する学位論文の発表，同18日口頭試問を行い，また平成16年1月28日主論文に関する審査員による書面審査を実施した。

発表内容はマウス脾臓由来の樹状細胞(DC)を用いたDCの細胞表面抗原の発現や遊走を制御する細胞内情報伝達機構の解析であり，次の諸点を明らかにした．1) 抗酸化物質であるNACが，DCにおけるCD40発現を選択的かつ可逆的に制御していることを見いだした．2) TNF- α は，DCにおけるp38 MAPKの活性化をそれぞれ早期に誘導し，NAC非感受性経路によってCD80，CD86分子およびMHC分子の発現量を制御することを明らかにした．一方，接触性皮膚炎を誘導する2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)は，p38 MAPKの活性化を遅延期に誘導し，NAC感受性経路によって共刺激分子やMHC分子の発現量を制御することを明らかにした．3) CCR7リガンドで刺激した成熟DCにおいて，細胞走化性亢進を制御する細胞内情報伝達機構の詳細は不明であった．今回，CCR7リガンドによる成熟DCの走化性誘導にJNKが関与していることを初めて見いだした．また，CCR7リガンドによるDCの走化性誘導には，JNK経路とRho経路の少なくとも独立した2つの経路が必須であることを明らかにした．DCは，生体防御反応の始動及び制御に非常に重要な役割を果たしており，今後のシグナル伝達分子を標的とした種々の治療薬の開発に極めて有益な知見を示した．

論文発表に続いて発表内容を中心として関連ある専門分野を含めた口頭試問を実施した．その内容は，本研究の背景，目的および関連分野等における知識，またDC cell lineの有用性や薬剤開発への応用とその根拠など多岐に亘った．これらに対する回答は，適切かつ高度なものであり，博士の学位を与えるに相応しいと判断した．

提出された学位論文の内容はよくまとまっており，その研究成果は独創的かつ有用性に富み，本専門研究分野の中で高く評価されるに値する内容

であると判断した。

以上の結果，本論文審査委員会は，飯島 則文氏を博士（薬学）の学位を授与するに相応しい十分な学力と研究能力を有するものと認めた。