

学位論文題名

細胞死による誘発抗原と樹状細胞応答に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景・目的】

近年、細菌やウイルスなどに対する自然免疫において、病原微生物特有の構成成分 (PAMPs) を認識する TLR (Toll-like receptor) が重要な役割を担っていることが明らかになった。LPS はグラム陰性菌の細胞壁成分であり、内毒素として発熱や炎症を誘導する。TLR ファミリーの一つである TLR4 はその LPS の受容体であり、強力な免疫賦活作用を誘導するのに必須の受容体であることが明らかとなった。また、細胞死はネクローシスとアポトーシスに大別されるが、細胞がネクローシスに陥ると細胞内容物が細胞外に漏出し、danger signal として炎症を誘導することが明らかとなっている。さらにネクローシス細胞の異常蓄積は慢性炎症や自己抗体の産生を誘導し、慢性炎症性疾患や自己免疫疾患の一因となることが知られている。しかし、それらの自己抗体やそれによって誘導される補体などがネクローシス細胞の免疫応答においてどのように関わっているかは明らかとなっていない。これらの解明が進めば、種々の疾患の診断や治療に発展する可能性がある。

ネクローシスを誘導した死細胞を免疫細胞が貪食する過程で、それらの貪食細胞や抗体および補体がどのような免疫応答および機能を担っているかについて検討を行った。

【対象と方法】

ネクローシス細胞、マウス樹状細胞およびマクロファージ、マウス血清、上記 monoclonal 抗体などを用いて *in vitro* の系で貪食細胞の死細胞に対する免疫応答と、それに関わる抗体や補体の機能を調べた。

ヒト死細胞で免疫したマウスから、死細胞を認識する monoclonal 抗体を得た。Anti-Fas 抗体や、熱刺激、UV 照射などの方法で細胞死を誘導し、それらに対する抗体や補体の結合を、AnnexinV や PI などの蛍光抗体、抗マウス免疫グロブリン二次抗体などを用いてフローサイトメトリー法にて評価した。

貪食の評価などは、主貪食細胞と死細胞を別の蛍光抗体で標識するなどの方法でフローサイトメトリー法により測定した。また、サイトカイン産生は主に貪食細胞と死細胞の共培養の上清を ELISA 法によって測定して評価した。

【結果】

種々の方法で誘導されたネクローシス細胞に抗体が結合することで補体の沈着が促進された。また、ネクローシス細胞に抗体および補体が結合することで、マクロファージの貪食効率が上昇した。樹状細胞がネクローシス細胞を貪食する際には、抗体や補体の結合で

IL-6 産生が上昇する傾向が見られたが、貪食効率には差は認められなかった。

LPS 存在化ではマクロファージからの IL-6 と TNF 産生が、ネクローシス細胞を貪食することで上昇した。これらのサイトカイン上昇の反応はマウス血清を添加することで抑制されたが、逆に IL-10 の産生は血清を添加することで産生が上昇した。これらの反応は IL-6 および TNF においては、C3KO マウスの血清を用いても変化なく、IL-10 の中和抗体を添加してもその抑制は解除されなかった。

【考察】

感染症においてはまず自然免疫が病原微生物の侵入を感知し生体防御反応を行うが、自然免疫系を活性化する受容体は不明であった。近年、TLR を介した自然免疫の解明が進んでおり、様々な PAMPs を認識し免疫応答を調節していることが明らかとなり、TLR4 はグラム陰性菌の細胞壁成分である LPS をリガンドとし、強力な免疫賦活作用を誘導するために必須の受容体であることがわかっている。

また補体は抗原のオプソニン化などを介して免疫細胞への貪食を促進するとされてきたが、近年、補体受容体の一種である CR1g がマクロファージなどに発現しており、その貪食応答などに重要な役割を担っていることが示された。

今回我々の検討では、ネクローシス細胞が抗体や補体で修飾されることでマクロファージの貪食効率が上昇することが示された。また、LPS 刺激下において、炎症性サイトカインの一つである IL-6 や TNF、また抑制性サイトカインの一つである IL-10 などのサイトカイン産生に変化がみられることが示された。それらの調整にはマウス血清に含まれる何らかの未知因子が関係していることが示唆されたが、IL-10 の産生上昇に関しては補体系 (C3) が関与している可能性が示された。

これらの結果は、死細胞の免疫調整は、貪食細胞や抗体・補体、TLR など様々な因子によって複雑に制御されているものと考えられた。

【結論】

- ・ ネクローシス細胞に抗体が結合することで、補体の沈着が促進された。
- ・ ネクローシス細胞に抗体が結合し補体が沈着することで、マクロファージによるネクローシス細胞の貪食効率が上昇した。
- ・ 抗体や補体が結合したネクローシス細胞に対し、樹状細胞は IL-6 産生を亢進させている可能性が示唆された。
- ・ LPS 刺激下では、マクロファージがネクローシス細胞を貪食することで、マクロファージからの IL-6 および TNF の産生が亢進した
- ・ 血清成分を加えることで、LPS 刺激下での死細胞貪食マクロファージから産生される IL-6 および TNF は抑制され、一方 IL-10 の産生は亢進した。
- ・ IL-6 や TNF の産生を抑制する因子は補体系 (C3) とは関連がなく、なんらかの未知の血清因子によるものの可能性が考えられた。
- ・ 補体成分 (C3) は、ネクローシス細胞を貪食したマクロファージからの IL-10 産生の亢進に関連していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 瀬 谷 司
副 査 准教授 田 中 淳 司
副 査 教 授 佐 邊 壽 孝
副 査 教 授 今 村 雅 寛

学位論文題名

細胞死による誘発抗原と樹状細胞応答に関する研究

<内容要約>本研究では抗体・補体関与するネクロシス死細胞の排除機構に関与する自然免疫系の新たな役割の解明に迫った。すなわち、培養細胞 (MT1) を用いたネクロシス細胞傷害系を作製し、それを免疫源にして死細胞のマウス特異抗体を作製した。その抗体と補体 (マウス血清) が MT1 死細胞をマクロファージに貪食促進させる際に、微生物成分 (パターン分子、PAMP) が存在すれば IL-10 過剰産生が起きて免疫抑制の表現型に変わることを証明した。結果はネクロシス細胞の貪食において貪食細胞内に補体刺激経路と toll-like receptor (TLR) 系のクロストークが起きることを示唆した。しかし、解析手技と研究遂行の不備のため詳細な機序の解明には至らなかった。

<質疑応答>

田中 淳司准教授から死細胞の調整法について検討をしているかどうか、MT1 (ヒト ATL 細胞株) を使ったことの意義について質問があった。FAS 抗体でアポトーシスを起こした細胞の更なる処理 (加熱など)、15 時間の放置、UV 照射などが必要であったこと、どの方法でもネクロシス (Annexin/PI double-positive) が誘導できたことを答えた。また、ATL の細胞株が必須であるわけではなく、FAS で死に易い性質と調整が簡便であったことを理由として答えた。ヒトマウスの種間相違が問題になるかはこの研究では言及しなかった。

佐邊 壽孝教授からどこまで自分で考えて進めたか、とこの仕事をもつ独創性について質問があった。また、論文の記載と発表の内容にギャップがあることも指摘された。申請者は自力で進めた部分 (死細胞特異抗体の作製とマクロファージの貪食促進活性系の確立) を強調し、独創性はマクロファージの貪食とサイトカイン産生がパラレルに増強しないことが補体—TLR 関与のシグナル応答の特徴であることを説明した。論文と学位審査の公表内容の相違は、当初の抗体作製の目的が死細胞特異抗体によって phosphatidyl serine 以外の蛋白性細胞死抗原を同定することにあつた、と云う見解を示した。

今村 雅寛教授から分子量 8 万の死細胞特異抗原 (細胞がネクロシスすることで細胞表面に出て来る分

子)は何か、と云う質問、また、単クローン抗体の作製条件についての質問があった。申請者は抗体が認識した分子量8万の分子は免疫ブロッティングで得られたものであり、それ以上の解析はしなかったこと、現在ならマスのプロテオーム解析が可能であることを答えた。MT1の死細胞は細胞内の分子が表面に出る変化を起こしたものを免疫源としたため、3種の特異抗体が取れたことを説明した。

瀬谷 司教授から PAMP の外因性シグナルに LPS を用いたことの意義、Annexin/PI 2重陽性細胞をネクロシス細胞としたことの意義、TLR 経路と補体受容体経路のクロストークの意義などの質問を受けた。申請者は抗体・補体が関与する免疫応答は細菌感染症が多いため、LPS (リポポリ多糖、gram 陰性細菌由来)を用いたことを述べた。2 つ目の質問には Annexin が phosphatidyl serine に特異結合し、PI (propidium iodide)が核内の DNA と結合する試薬であることから両方で染まる細胞をネクロシス細胞とした、と答えた。最後の質問はまだ未解明のシグナル系が補体レセプターの下流にあり、それが TLR のシグナル産物を修飾するようなモデルを考案していることを告げた。

最後の議論で補体系の欠損症における自己免疫疾患の高頻度と本知見 (感染・食食時の補体による免疫抑制シグナルの起動)との関連について質問があった。重要なポイントなので discussion に取り入れて今後の考案の糧としたい。