

学位論文題名

ウシ軟骨由来コンドロモジュリン-IがT細胞の増殖に及ぼす影響
-*in vitro*モデル系による自己免疫疾患治療剤としての検討-

学位論文内容の要旨

ウシコンドロモジュリン-I (ChM-I) は畜産副生物である軟骨等に特異的に存在するマトリセセラータンパク質であり、その血管新生阻害作用に着目した癌あるいは関節リウマチ治療剤としての可能性が検討されてきた分子である。一方、近年、ChM-I が免疫担当細胞の増殖制御能をも有することが示され、従来の血管内皮細胞を標的とした癌、関節リウマチ治療剤に加え、免疫担当細胞を標的とした自己免疫疾患治療剤としても可能性が高いことが示唆されている。しかし、免疫担当細胞に対する ChM-I の作用機序等は未だ解明されておらず、また、免疫担当細胞を用いた自己免疫疾患の *in vitro* モデル系そのものが未だ研究途上であるが故に、ChM-I の自己免疫疾患治療剤としての可能性を精査するには至っていない。そこで、本研究では、免疫担当細胞を用いた自己免疫疾患の *in vitro* モデル系を新たに構築し、ウシ軟骨由来 ChM-I の自己免疫疾患治療剤としての可能性を検討した。得られた知見の要約は以下の通りである。

1. マウス脾臓由来T細胞の培養系に、外来抗原を認識するT細胞受容体構成タンパク質のCD3eを架橋する抗CD3e抗体、およびT細胞が外来抗原を認識した後に自らを増殖させるために産生するサイトカインの一種であるIL-2を加えることで、自己免疫疾患の一種である多発性筋炎等において認められるCD8T細胞の増殖特性、即ち、CD4T細胞数に比較してCD8T細胞数が優位に増加するという事象を再現する *in vitro* モデル系（抗CD3e抗体/IL-2刺激培養系）を新規に確立した。
2. 本研究において構築した新規 *in vitro* モデル系におけるCD8T細胞の増殖を規定する因子を検討し、CD8T細胞の易増殖性は、IL-2刺激に対するCD8T細胞の易感受性、即ち、CD8T細胞は、その細胞表面のIL-2受容体発現量がCD4T細胞とほぼ同程度であるにも拘らず、IL-2刺激時においてはCD4T細胞よりも強く持続的なIL-2受容体シグナル伝達分子（Jak1、Jak3、STAT5、ERK、Akt）の活性化に起因する可能性を見出した。さらに、本モデル系を用いた検討により、IL-2受容体シグナル伝達経路において最も上流に位置する分子であるCD45の脱リン酸化活性が、CD8T細胞とCD4T細胞との間で異なることを見出し、さらにIL-2刺激後にCD8T細胞に特異的に発現するCD45アイソフォームは低活性型（CD45RBC）である一方、CD4T細胞に特異的に発現するCD45アイソフォームは高活性型（CD45RO）であることを明らかにした。また、CD45RBCあるいはCD45RO遺伝子導入実験により、CD8T細胞

胞の IL-2 刺激に対する易感受性が、CD8T 細胞に特異的に発現する低活性型 CD45 アイソフォーム (CD45RBC) に起因することを証明した。以上の結果より、CD8T 細胞の異常増殖が認められる多発性筋炎等の自己免疫疾患を抑制する治療剤の開発においては、本研究にて構築した新規 *in vitro* モデル系を用い、CD8T 細胞における CD45RBC 発現抑制効果について検討することが重要であると推察された。

3. グアニジン塩酸抽出、アセトン分画、ゲルろ過クロマトグラフィーおよびヘパリンクロマトグラフィーといった比較的簡便かつ工業的にも繁用されている精製方法で、血管内皮細胞増殖抑制作用および T 細胞増殖抑制作用といった生理学的活性を保持した高純度の ChM-I をウシ軟骨から精製できることを示した。以上の結果は、畜産副産物であるウシ軟骨を材料とした ChM-I の工業的生産が比較的容易に可能であることを示唆するものであった。
4. 本研究において構築した新規 *in vitro* モデル系を用い、ウシ ChM-I が低活性型 CD45 アイソフォーム (CD45RBC) を高活性型 CD45 アイソフォーム (CD45RO) へ変換させるという、これまでに報告のない新たな生理学的機能を有することを明らかにした。また、ウシ ChM-I がその CD45 アイソフォーム発現調節機能を介し、CD45 下流に位置する Jak1 のリン酸化を抑制することで T 細胞増殖抑制作用を示すことを見出した。さらに、ChM-I は CD4T 細胞に対しては作用せず、ChM-I が有する CD45 アイソフォーム発現調節機能は CD8T 細胞に対して特異的に発揮されることを示した。これらの結果は、CD8T 細胞が病因となっている自己免疫疾患に対する治療剤としてのウシ ChM-I の新たな可能性を示すものであった。

本研究では、多発性筋炎等の CD8T 細胞が病因である自己免疫疾患の *in vitro* モデル系を構築し、ウシ軟骨由来 ChM-I の自己免疫疾患治療剤としての可能性を検討し、ウシ ChM-I がステロイド性治療剤等の既存自己免疫疾患治療剤にない優れた特長を有することを明らかにした。即ち、病態の原因である CD8T 細胞の増殖を抑制する一方、一般的にヘルパー T 細胞といわれる CD4T 細胞の増殖は抑えない故に感染症を発症するリスクが少ないという自己免疫疾患治療剤となり得る可能性を見出した。

また、本研究の結果は、多発性筋炎等と同じく CD8T 細胞の異常増殖が関与していると考えられている高齢者の易感染症に対してもウシ ChM-I が有用である可能性を提示するものであり、そのため、特定の自己免疫疾患治療剤としてだけではなく、健康を維持するためのサプリメント等としてもウシ ChM-I は有用であることを示唆するものであった。

本研究成果は、畜産副産物であるウシ軟骨の有効利用、特にその構成要素の生体調節機能を活用した高度利用に繋がる非常に重要なものであり、さらに、本研究において構築した新規 *in vitro* モデル系は自己免疫疾患治療剤の開発において有用であるとともに、広義の家畜である実験動物に対するアニマルウェルフェアの観点からも、動物実験削減手段の一つとして畜産学的にも意義のあるものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	中 村 富美男
副 査	教 授	西 邑 隆 徳
副 査	准教授	福 永 重 治
副 査	助 教	小 林 謙

学 位 論 文 題 名

ウシ軟骨由来コンドロモジュリン-IがT細胞の増殖に及ぼす影響 -*in vitro*モデル系による自己免疫疾患治療剤としての検討-

本論文は6章からなり、図38、表1、文献70を含む頁数111の和文論文であり、別に参考論文3編が付されている。

コンドロモジュリン-1 (ChM-I) は畜産副生物である軟骨等に特異的に存在するマトリセルラータンパク質であり、その血管新生阻害作用に着目した癌あるいは関節リウマチ治療剤としての可能性が検討されてきた分子である。一方、近年、ChM-I が免疫担当細胞の増殖制御能をも有することが示され、従来の血管内皮細胞を標的とした癌、関節リウマチ治療剤に加え、免疫担当細胞を標的とした自己免疫疾患治療剤としても可能性が高いことが示唆されている。しかし、免疫担当細胞に対するChM-Iの作用機序等は未だ解明されておらず、また、免疫担当細胞を用いた自己免疫疾患の*in vitro*モデル系そのものが研究途上であるが故に、ChM-Iの自己免疫疾患治療剤としての可能性を精査するには至っていない。そこで、本研究では、免疫担当細胞を用いた自己免疫疾患の*in vitro*モデル系を新たに構築し、ウシ軟骨由来ChM-Iの自己免疫疾患治療剤としての可能性を検討し、以下の知見を得ている。

1. 自己免疫疾患の一種である多発性筋炎等において認められるCD8T細胞の増殖特性、即ち、CD4T細胞数に比較してCD8T細胞数が優位に増加するという病態を*in vitro*で再現するマウス脾臓由来T細胞の培養系（抗CD3e抗体/IL-2刺激培養系）を新規に確立した。
2. 新たに構築した*in vitro*モデル系におけるCD8T細胞の増殖を規定する因子を検討し、CD8T細胞の増殖性は、IL-2刺激に対するCD8T細胞の易感受性に因ることを明らかにした。また、CD8T細胞のIL-2刺激に対する易感受性は、CD8T細胞のIL-2受容体シグナル伝達経路において最も上流に位置する分子である

CD45 の脱リン酸化活性に起因する可能性を見出した。さらに、IL-2 刺激後に CD8T 細胞に特異的に発現する低活性型 CD45 アイソフォーム (CD45RBC) が、CD45 下流のシグナル伝達分子である Jak1 を持続的に活性化することで CD8T 細胞に易増殖性をもたらしていることを証明した。以上の結果より、CD8T 細胞の異常増殖が認められる多発性筋炎等の自己免疫疾患を抑制する治療剤開発においては、新たに構築したモデル系を用い、CD8T 細胞における CD45RBC 発現抑制効果について検討することが重要と推察した。

3. グアニジン塩酸抽出、アセトン分画、ゲルろ過クロマトグラフィーおよびヘパリンアフィニティークロマトグラフィーといった比較的簡便かつ工業的にも繁用されている方法で、高純度の ChM-I をウシ軟骨から精製できることを示した。また、得られた ChM-I が血管内皮細胞増殖抑制作用および T 細胞増殖抑制作用を保持していることを示し、畜産副生物であるウシ軟骨を材料とした生理活性物質としての ChM-I の工業的生産が比較的容易に可能であることを示唆した。
4. 本研究において構築した *in vitro* モデル系を用い、ウシ ChM-I は、CD8T 細胞に対しては低活性型 CD45 アイソフォーム (CD45RBC) を高活性型 CD45 アイソフォームへ変換させるという、これまでに報告のない新たな生理機能を有することを明らかにした。また、ChM-I が CD45 アイソフォーム発現調節機能を介し、Jak1 のリン酸化を抑制することで CD8T 細胞の増殖抑制作用を示すことを見出した。さらに、ChM-I は CD4T 細胞に対しては何ら作用せず、ChM-I が有する CD45 アイソフォーム発現調節機能は CD8T 細胞に対して特異的に発揮されることを示した。
5. 上記の結果から、ウシ ChM-I は、ステロイド性治療剤等の既存自己免疫疾患治療剤にない優れた特長を有することを明らかにした。即ち、病態の原因である CD8T 細胞の増殖は特異的に抑制するが、一般的にヘルパー T 細胞といわれる CD4T 細胞の増殖は抑えない故に、ChM-I が感染症を発症するリスクが少ない自己免疫疾患治療剤となり得る可能性を見出した。また、多発性筋炎等と同じく CD8T 細胞の異常増殖が関与している高齢者の易感染症に対しても ChM-I が有効である可能性を示し、自己免疫疾患治療剤としてだけでなく、健康を維持するためのサプリメント等としてもウシ ChM-I は有用であることを示唆した。

以上のように本論文は、ウシ軟骨の構成成分である ChM-I が有する生体調節機能を新たに見出し、その具体的な有効利用法を提案している。また、本研究において構築した新規 *in vitro* モデル系が自己免疫疾患治療剤の開発におけるスクリーニング系として有効であることも示している。よって、審査員一同は、關 巖が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。