

学位論文題名

Functions of dendritic cells modified
by the maturational stage

(成熟段階により修飾される樹状細胞の機能)

学位論文内容の要旨

樹状細胞 (dendritic cells, DC)は最も効率的な抗原提示細胞で、獲得免疫の増強、制御に重要な役割を担っている。DCの成熟は、種々の細胞外からの刺激により制御される。またDCの成熟度は、これらの形態、表現形、機能の変化と密接に関わっている。特に炎症部位における炎症性サイトカインや細菌成分は、強いDC成熟因子として知られている。成熟DCは、主要組織適合複合体(MHC)や、共刺激因子を細胞表面に高発現する。これらは更に末梢組織から所属リンパ節へ遊走し、ヘルパーT細胞を活性化する。この抗原提示の過程で、DCはTヘルパータイプ1(Th1)、またはTヘルパータイプ2(Th2)の分化を誘導する。その際、T細胞のCD40リガンドと、DCのCD40との相互作用により、成熟及びインターロイキン(IL)-12産生誘導のシグナルが、DCに伝達されることが知られている。IL-12はTh1分化誘導、及びTh2分化抑制に重要な働きをすることが既に報告されている。他にも、Th1/Th2のバランスに影響する因子として、DCのタイプ、サイトカイン産生に関わる遺伝的背景、細胞周期、共刺激因子、T細胞受容体(TCR)とMHC間の親和性、DC/T細胞比、抗原濃度、抗原の種類などが報告されている。

これまでマウスの樹状細胞を得るために、骨髓細胞をGM-CSF存在下で培養し、DCに分化誘導する方法と、脾臓などからDC特異的抗体を用いて直接精製する方法が用いられてきていた。しかし、前者は各DCの成熟段階が不揃いで、分化誘導にかかる日数の違いでDCの機能差が生じ、後者の方法で精製したDCは、培養中に自発的に成熟・アポトーシスが誘導される。従って、いずれの方法においても、DCの成熟段階を明確に区別して機能解析を行うことが困難であった。この問題を解決するために、BALB/cマウス脾臓由来のDC株(BC1)を樹立した。BC1の長所として、長期の培養においても各細胞が未成熟のまま安定していることが挙げられる。また類似の培養系を用いて、抗原の取り込み、炎症性サイトカインによる成熟、抗原提示、サイトカイン産生などの機能において、生体内DCと同様の性質を保持することが、世界的に確認されている。

炎症性サイトカインの一種である tumor necrosis factor- α (TNF- α)は、炎症局所で産生され、DCの成熟を誘導する。我々は以前、TNF- α がBC1のアロT細胞刺激活性を増強することを報告した。しかし、TNF- α のTh1、Th2細胞分化誘導に与える影響については明らかでなかった。そこで同じシステムを用い、TNF- α 刺激により、DCのTh増殖誘導能、及び分化誘導能がどの様に変化するかを解析し、同様に強いDC成熟因子である lipopolysaccharide(LPS)によるものと比較した。

まず、TNF- α により成熟誘導した DC (TNF/DC), 及び LPS により成熟誘導した DC (LPS/DC)が、未成熟 DC (immature DC, iDC)と比べ、細胞表面上の共刺激因子や MHC を高度に発現していることを明らかにした。また TNF/DC と比べて、LPS/DC は共刺激因子を有意に高発現しており、卵白アルブミン(OVA)特異的 T 細胞(DO11.10)に対する増殖誘導能においても、TNF/DC より強いことが判明した。これらの結果より、異なる DC 成熟因子間において、機能的な差異が存在することが明らかになった。

次に、DC による Th1/Th2 分化誘導能を解析した。その結果、高濃度抗原存在下では Th1 が、低濃度抗原存在下では Th2 が優位に誘導されることが確認された。更に、iDC, TNF/DC, LPS/DC 間で、これらの Th1/Th2 分化誘導能を比較した。低濃度抗原存在下では、TNF/DC と iDC の IL-12 産生量はほぼ同等であった。しかし、注目すべきことに、Th2 分化誘導能においては、TNF/DC が iDC より有意に強かった。以上より、TNF- α が DC の Th2 分化誘導を特異的に増強することが初めて明らかになり、またこの強い Th2 分化誘導は、必ずしも IL-12 の産生量に依存しないことが判明した。低濃度抗原の存在と、高い共刺激因子発現という条件が、TNF/DC による著明な Th2 誘導に重要と考えられた。しかし、類似の条件と考えられる LPS/DC は TNF/DC と比べ、強い IL-12 産生能と、有意に弱い Th2 分化誘導を示した。LPS/DC の Th2 分化誘導が弱いのは、高い IL-12 産生によるものと考えられた。

上記の結果により、DC による Th1/Th2 分化誘導において、IL-12 依存性機序と、非依存性機序が存在することが判明した。しかし、IL-12 が強い Th1 分化誘導能と、Th2 分化抑制能を持つことは既に確立されている。そこで、次に IL-12 依存性経路の制御法について検討した。DC による IL-12 産生は、炎症に伴う刺激因子や、CD40-CD40 リガンド結合を介した T 細胞からの刺激により誘導される。これらの経路に関与する細胞内シグナル伝達の機序は完全には明らかになっていないが、mitogen-activated protein kinase (MAPK)が IL-12 産生の制御に関与することが報告されている。MAPK は extracellular signal-related kinases (ERK)や p38 MAPK などから構成される。ERK は IL-12 産生を負に制御し、p38 MAPK は正に制御する。しかし、CD40 を介するシグナルに対する MAPK の制御については不明で、成熟 DC と未成熟 DC の相違についても報告はない。そこで、成熟および未成熟の BC1 を用い、抗 CD40 抗体による架橋刺激で IL-12 産生を誘導し、ERK 特異的阻害物質(PD98059)と、p38 MAPK 阻害物質(SB203580)による影響を調べた。その結果、ERK は iDC と TNF/DC において CD40 刺激を介する IL-12 産生を負に制御するが、LPS/DC では全く影響を与えないことが判明した。一方 p38 MAPK は、iDC で IL-12 産生を正に制御するが、成熟 DC では制御しないことを明らかにした。

本研究で、DC の Th1/Th2 分化誘導能に対する TNF- α の新しい役割を示した。また、DC の成熟段階や、成熟誘導因子により、IL-12 産生に関与するシグナル伝達機構に、機能的差異があることも明らかにした。今回の知見は、悪性腫瘍、アレルギー、自己免疫などの疾患の制御法を開発していく上で、重要な方向性を示したと考える。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 西 村 孝 司

学 位 論 文 題 名

Functions of dendritic cells modified by the maturational stage

(成熟段階により修飾される樹状細胞の機能)

炎症末梢組織で成熟誘導された樹状細胞 (DC) は、所属リンパ節へ遊走し、ヘルパー T 細胞に対し強い抗原提示能を示す。T 細胞はそこで Th1, または Th2 に分化する。この時 CD40-CD40L 相互作用により、DC の産生する IL-12 が、Th1 分化を誘導することが知られている。他に、Th1/2 分化に抗原濃度が影響することも報告されている。

一方、TNF- α は DC 成熟を誘導するが、Th1/2 分化誘導への影響は不明である。そこで、TNF- α による DC の Th 分化誘導能変化を解析し、LPS によるものと比較するため、BALB/c マウス脾臓由来の DC 株 (BC1) を樹立した。BC1 は長期培養において安定したラインで、生体内未成熟 DC と同様の性質を保持していた。

まず、TNF- α または LPS により成熟誘導した DC (TNF/DC, LPS/DC) では、未成熟 DC (iDC) と比べ、MHC, 補助刺激分子の発現や、OVA 特異的 T 細胞に対する増殖誘導能が増強していた。またこれらの機能は、LPS/DC の方が TNF/DC より強いことが判明した。

次に、DC の Th1/2 誘導能を解析したが、高濃度抗原存在下では Th1 が、低濃度抗原存在下では Th2 が優位に誘導された。低濃度抗原存在下において、TNF/DC と iDC の IL-12 産生量は同等であったが、Th2 分化誘導能は TNF/DC の方が有意に強かった。以上より、TNF- α が DC の Th2 分化誘導を増強すること、これは IL-12 量に依存しないことが判明した。

最後に、IL-12 依存性経路の制御法を検討した。DC による IL-12 産生は、主に CD40-CD40L 結合を介した T 細胞からの刺激により誘導される。これまで、ERK は IL-12 産生を負に、p38 MAPK は正に制御することが示唆されている。しかし、CD40 シグナルに対する制御、更に成熟 DC と未成熟 DC の相違について報告はない。成熟および未成熟の BC1 を抗 CD40 抗体により刺激して IL-12 産生を誘導し、ERK または p38 MAPK の特異的阻害物質による影響を調べた。その結果、ERK は iDC と TNF/DC において、IL-12 産生を

負に制御するが、LPS/DCでは影響しないこと、一方 p38 MAPK は、iDC で IL-12 産生を正に制御するが、成熟 DC では制御しないことが判明した。

口頭発表後、副査の上出教授から、BC1 の細胞系、成熟 BC1 のケモカインレセプター、Th1/2 分化の差とサバイバルの差、膜結合型 TNF による刺激を行なったか質問があった。申請者は、BC1 細胞は myeloid DC であること、成熟 DC は CCR7 を発現すること、各細胞の viability に差がなかったこと、また膜結合型 TNF の実験系は確立されていないことを説明した。ついで副査の西村教授から、BC1 はクローンか、TNF- α の Th2 誘導能増強は ERK による CD40-40L 経路の遮断と考えるべきか、TNF- α による DC の ERK 発現の有無、また BC1 が TLR9 を介する刺激に反応するか、他の DC を使って同様の実験をしたか質問があった。申請者は、BC1 は均一な細胞ラインであること、IL-12 産生抑制は ERK によると考えるが IL-12 非依存性の経路については不明であること、TLR の発現、BC1 以外の DC については未解析であると回答した。最後に主査の小野江教授が、LPS、TNF- α 刺激後の下流分子について、実際の感染における TNF- α と LPS の役割について質問があった。申請者は、LPS 刺激後の TLR4/CD14 下流の経路が重要であること、しかし、シグナルの強さ、または質の相違と取るかは、現時点では明言できないこと、今回の高濃度 TNF- α のみの刺激は、生体内では実現しにくく、むしろ細胞免疫療法への応用開発と考えていると説明した。これに対し副査の西村教授から、生体内でも同様の Th2 誘導増強を再現出来る可能性があるとの指摘があった。

本研究で、Th1/2 分化に対する TNF- α の新しい役割を示し、また DC の成熟によって、CD40 シグナル伝達機構に、機能的差異があることも明らかにした。今後の免疫疾患の制御法開発への応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。