

# 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 若狭 健太郎

## 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

### 【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、食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、ネクロシス細胞を食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 IL6 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食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 CRIg がマクロファージなどに発現しており、その食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食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、食食細胞や抗体・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シス細胞の食食効率が上昇した。
- ・ 抗体や補体が結合したネクロシス細胞に対し、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シス細胞を食食することで、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 刺激下での死細胞食食マクロファージから産生される IL6 および TNF は抑制され、一方 IL-10 の産生は亢進した。
- ・ IL6 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、ネクロシス細胞を食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。