

氏名(本籍)	臼井健太(茨城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第6204号
学位授与年月日	平成24年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	IgM受容体 Fc α / μ R の濾胞樹状細胞における機能解析

主査	筑波大学教授(連携大学院)	博士(医学)	中村幸夫
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	上杉憲子
副査	筑波大学准教授	医学博士	竹内薫
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	松本功

論文の内容の要旨

(目的)

IgM受容体 Fc α / μ 受容体(以下 Fc α / μ R)欠損マウスの解析から、Fc α / μ Rが、濾胞樹状細胞(Follicular Dendritic Cell; FDC)において発現し、FDCにおける抗原捕捉及びそれに伴う胚中心形成に関与していることを所属研究室が報告していた。Fc α / μ RがFDCにおいてどのように液性免疫応答を制御しているのか、詳細に解析するため、FDCの新たな単離法の開発を試み、単離されたFDCを材料として、Fc α / μ RがFDC上でどのような機能を果たしているのかを明らかにすることを目的とする。

(対象と方法)

コラーゲン分解酵素およびDNA分解酵素存在下で処理したマウス脾臓細胞を、フローサイトメトリー法を用いてFDCの同定を試みた。FDCをCD45陰性FDC-M2陽性ICAM-1陽性細胞として単離し、RT-PCR法を用いて、FDCに特徴的な遺伝子発現を解析した。また、FDCの維持成熟に必須の因子であるTNF- α および抗LT β Rアゴニスト抗体存在下で7日間培養し、免疫細胞染色を施し、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。単離培養後の当該細胞についてB細胞への補助作用を解析するため、LPS存在下もしくは非存在下においてB細胞と共に共培養し、B細胞の生存および増殖応答について検討した。単離培養後のFDCにおいてFc α / μ Rの発現局在およびLPS刺激応答性の発現移行について詳細に解析するため、抗Fc α / μ R抗体を用いて免疫細胞染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。単離培養後のFDCにIgM免疫複合体を添加し、免疫細胞染色法を用いて細胞内への抗原の取り込みを検討した。また、in vivoにおいて実際に抗原が細胞内に取り込まれているか検討する目的で、抗原投与後の脾臓FDCにおける抗原の取り込みを細胞内染色法およびフローサイトメトリー法にて解析した。

(結果)

コラーゲン酵素処理にて調整した脾臓細胞中の非造血系CD45陰性細胞中にFDC-M2陽性細胞を同定し、接着分子であるICAM-1を発現していることを明らかにした。このCD45陰性FDC-M2陽性ICAM-1陽性細胞(以下当該細胞とする)は、VCAM-1やCD40、CD16/32(Fc γ RII/III)など、すでにFDC上での発現が報告されている分子群について発現を認め、またFDCが産生していると報告されている*Mfge8*遺伝子の発現も

よび Cr2 遺伝子の高い発現を認めた。単離培養後の当該細胞は、免疫細胞染色により、FDC 特異マーカーである FDC-M1 や FDC-M2、Fca/μR について発現しており、また細い樹状突起を伸長し、細胞同士が複雑に絡み合い、網状組織を形成していた。単離培養後の当該細胞を B 細胞と共培養したところ、B 細胞の生存および LPS 刺激応答性の B 細胞の増殖が、陰性対象細胞との共培養、B 細胞のみ培養した場合に比較し、優位に増加していた。また本実験において観られた LPS 刺激応答性の B 細胞増殖の亢進は、抗 BAFF 中和抗体の添加によって阻害された。単離培養後の FDC の解析において、Fca/μR が定常状態では小胞体およびゴルジ体に発現が局在しており、LPS 刺激応答性に細胞膜上の発現が亢進した。in vitro において、TNP-Ficoll および抗 TNP-IgM 抗体を免疫複合体として添加したところ、Fca/μR 欠損マウス由来 FDC は抗原を取り込まなかったが、野生型マウス由来 FDC は抗原を細胞内に取り込んだ。In vivo における解析でも、Fca/μR 欠損マウス由来 FDC は、野生型マウス由来 FDC に比較し、細胞外の抗原量が増加し、細胞内の抗原量が減少していた。

(考察)

フローサイトメトリー法および遺伝学的、解剖学的な解析から、CD45 陰性 FDC-M2 陽性 ICAM-1 陽性細胞は FDC において特徴的な表現型を呈しており、また共培養の実験から、B 細胞の補助作用を有していることから、当該細胞を FDC であると断定した。また当該細胞が産生する BAFF を介して B 細胞の増殖応答を補助していることを in vitro にて、初めて証明した。また、FDC における Fca/μR の発現解析から、小胞体やゴルジ体に局在するということが世界に先駆けて発見した。また、in vitro および in vivo において、FDC が Fca/μR を介して細胞内に抗原を取り込むことを明らかにした。細胞内に抗原を取り込むことで、細胞膜上の抗原量を制御し、抗原を認識する B 細胞の活性を制御し、胚中心形成を抑制していることが示唆された。

審査の結果の要旨

所属研究室において新規に発見・単離した IgM 受容体に係る機能解析の一環として、濾胞樹状細胞における機能解析を目的とした研究内容である。生体中の濾胞樹状細胞における機能解析を実施するに当たっては、当該細胞を高純度で回収する技術の開発がまずは必須であり、本研究は濾胞樹状細胞を高純度で回収する技術の開発に成功したものであり、独自性と先導性を有するきわめて優れた研究成果と判断できる。

平成 23 年 12 月 26 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。