

氏名	佐藤 和貴		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 8248 号		
学位授与年月	平成 29年 3月 24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	脾臓間質細胞による死細胞排除とその生理的意義		
主査	筑波大学教授	医学博士	高橋 智
副査	筑波大学教授	医学博士	住田 孝之
副査	筑波大学教授	博士（医学）	藤本 学
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	坂田 麻実子

論文の内容の要旨

佐藤氏の学位論文は、脾臓における死細胞貪食能を有する間質細胞を同定し、その生理的意義を検討したものである。その要旨は以下の通りである。

（目的）

本論文では、脾臓間質細胞の貪食能を明らかにすることを目的として研究を行なっている。

（対象と方法）

本論文では、脾臓間質細胞の貪食をプライマリー細胞を用いて解析するために、脾臓間質細胞を定常状態マウスから単離する手法を報告している。その手法を用いて、死細胞の貪食能を検証するために、デキサメサゾンを用いて細胞死（アポトーシス）を誘導した胸腺細胞を使用している。死細胞貪食を定量的に解析するために、アポトーシス胸腺細胞を pHrodo を用いて標識している。pHrodo は酸性条件下でのみ蛍光を発色するため、酸性に保たれている細胞小器官リソソームに pHrodo 標識細胞が貪食ののちに輸送された場合に、シグナルが検出可能となる。pHrodo 標識アポトーシス細胞を C57BL/6 マウスに経静脈的に投与し、30 分後の脾臓間質細胞をフローサイトメーターを用いて解析している。

また、免疫応答を誘導する際に広く用いられるアラムアジュバント（Alum）が、細胞障害活性を持ち、細胞死を誘導することが知られている。そこで著者は、抗原（NP-CGG）と Alum を C57BL/6 マウスに腹腔内投与し、免疫応答誘導後（2 週間）の脾臓間質細胞をフローサイトメーターを用いて解析している。アポトーシス細胞の特徴である DNA の断片化を認識する TUNEL 染色法を用いて、貪食されたアポトーシス細胞を検出している。

濾胞内におけるアポトーシス B 細胞の貪食を評価するために、B 細胞特異的に発現する CD19cre と cre/loxp システムを用いて、B 細胞特異的に EGFP を発現する CD19cre・Z/EG マウスを樹立している。これにより、B 細胞を貪食した細胞は GFP 陽性細胞として検出可能となる。CD19cre・Z/EG マウスに

NP-CGG/Alum を腹腔内投与し、2 週間後に脾臓間質細胞をフローサイトメーターを用いて解析している。

(結果)

著者は、pHrodo 標識アポトーシス細胞を投与したマウス脾臓間質細胞における pHrodo の蛍光強度を測定したところ、コントロール群である pHrodo 染色非アポトーシス細胞投与マウスより単離した脾臓間質細胞と比較して、血管内皮細胞(BEC)分画および辺縁細網細胞 (MRC) 分画において有意に pHrodo の蛍光強度が上昇していることを明らかにしている。NP-CGG/Alum 投与の系においても、BEC および MRC において TUNEL の蛍光強度が上昇していることを確認している。定常 CD19cre・Z/EG マウス由来間質細胞においては、いずれの間質細胞においても GFP 陽性分画は認められなかった。しかし、NP-CGG/Alum 投与 CD19cre・Z/EG マウス由来の脾臓間質細胞を解析したところ、BEC 分画においては GFP 陽性分画が確認できなかったが、CD31 陰性分画において GFP 陽性となる分画が観察されたため、アポトーシス B 細胞の貪食には MRC が関与していることが示されている。

本論文では、二次リンパ組織である脾臓の間質細胞のうち、BEC および MRC が免疫応答誘導時において貪食細胞として機能していることが示されている。BEC は血液循環中のアポトーシス細胞の貪食し、MRC は濾胞内におけるアポトーシス B 細胞の貪食を行っていることが示唆されている。

(考察)

間質細胞は組織を形作る骨組みのような役割をしており、その局在は厳密に定められている。BEC は、脾臓を含む全身の血管を構成している細胞であり、そのため血中に含まれる細胞や老廃物と常に接している状態にある。著者は、このような特徴をもつ BEC が血中のアポトーシス細胞の貪食を行い、血中の恒常性維持に関与していることは非常に合理的であると考察している。一方で、MRC は赤脾髄と濾胞(白脾髄)の境界における辺縁帯に局在しているため、どちら由来の物質とも接触することが可能である。このことから、著者は MRC は濾胞内で発生したアポトーシス B 細胞、および血中由来のアポトーシス細胞を排除することで、二次リンパ節の恒常性維持に関与していることを推定している。

貪食細胞はアポトーシス細胞上に曝露される PS を PS 受容体を介して認識する。PS 受容体はこれまでに数多く報告されており、発現する細胞の種類や、発現するためのシグナル・細胞の状態が異なっていることが知られている。それぞれの遺伝子欠損マウスの表現型が報告されており、アポトーシス細胞排除が損なわれることで、自己抗原が蓄積し、過剰な炎症を伴う自己免疫疾患や炎症性腸疾患を起こす場合が多い。しかしながら、それ以外にも肺や腎臓の線維症、脳におけるミクログリアの欠損、受精能の低下など各 PS 受容体遺伝子欠損マウスの症状は多岐に渡っているため、著者は、いずれの PS 受容体を介して貪食が誘導されているか解析することは、生体内における生理的意義を解明する上で極めて重要であると考察している。今後、BEC および MRC における PS 受容体の発現解析を行っていく必要があると考えている。定常状態に加えて、免疫応答を誘導した際の遺伝子発現解析を同時に行うことで、より包括的な脾臓間質細胞の貪食機構の理解につながると考察している。

審査の結果の要旨

(批評)

本論文では、脾臓間質細胞の中で、BEC および MRC がアポトーシス細胞の貪食能を有していることを明らかにしている。BEC は血液循環中のアポトーシス細胞を貪食しており、MRC は濾胞において発生するアポトーシス B 細胞を貪食していることが示されている。この知見は、間質細胞がアポトーシス細胞を迅速に処理することで自己抗原の漏洩を防ぎ、自己免疫応答の発症を抑制している可能性を示したものとして評価される。

平成 29 年 1 月 16 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）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。