

氏名	田中健人		
学位の種類	博士（ 生物工学 ）		
学位記番号	博 甲 第 8 6 1 9 号		
学位授与年月日	平成 3 0 年 3 月 2 3 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	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Elucidation of Distinct Roles of Guinea Pig CXCR1 and CXCR2 in Neutrophil Migration by Inhibitory Antibodies (阻害抗体によるモルモットCXCR1とCXCR2の好中球遊走における機能評価)		
主査	筑波大学教授	理学博士	中村幸治
副査	筑波大学教授	博士（生物工学）	楊 英男
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	内海真生
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	山田小須弥

論 文 の 要 旨

本論文において著者は、好中球活性化において重要な役割を担っている CXCR1 と CXCR2 の機能分担を解明し、好中球性の炎症性気道疾患治療研究へ貢献することを目的として、DNA 免疫法により、炎症性疾患モデル動物として有用なモルモットの CXCR1 (gpCXCR1) と CXCR2 (gpCXCR2) に対する阻害抗体を新規に取得し、これまで明らかでなかったモルモット好中球遊走における CXCR1 と CXCR2 の機能分担を解明している。

まず第一章では、CXCR1、CXCR2 とそのリガンドについて、正常、病態における生理的機能を概説した。また両受容体、リガンドの種差について言及し、ヒトと類似性の高いモルモットの、炎症性疾患治療研究における有用性を指摘、課題として、特異的阻害剤がなく生体内での gpCXCR1、gpCXCR2 の機能分担解明が進んでいないことを提示した。

第二章では、DNA 免疫法によって gpCXCR1 と gpCXCR2 に対する阻害抗体を取得している。CXCR1 と CXCR2 はいずれも七回膜貫通受容体であり、構造を維持した抗原の調製が困難なことから、抗原蛋白を利用せず、発現プラスミドによって直接抗原を免疫動物内で発現させる DNA 免疫法による抗体取得を検討した。gpCXCR2 に対して、三種類のマウス DNA 免疫法を実施、血清抗体価を比較することで、抗原発現プラスミドの筋注後に電気穿孔法を実施する DNA 免疫法が効率的に免疫を惹起することを見出した。本 DNA 免疫法で gpCXCR1 と gpCXCR2 に対して免疫を実施し、ハイブリドーマ法でマウスモノクローナル抗体を単離、gpCXCR1、gpCXCR2 に対する特異的抗体の取得に初めて成功した。同時に、抗体の機能評価系として、gpCXCR1、gpCXCR2 を安定発現させた CHO-K1 細胞を樹立し、gpCXCR1、gpCXCR2 共通リガンドのモルモット IL-8 (gpIL-8) で遊走することを確認した。また、これまで遺伝子は同定されていたものの、作製が困難でその機能が確認されていなかったモルモット GRO α (gpGRO α) について、ペリプラズムへの移行シグナルを付加することで作製を可能にし、ヒトと同様に gpCXCR2 特異的リガンドであることを新たに示した。この遊走評価系において、取得した抗 gpCXCR1、あるいは抗 gpCXCR2 抗体は、各受容体依存的な遊走を特異的に抑制したことから、両抗体は目的としていた機能阻害抗体であった。

第三章では、第二章で取得した抗 gpCXCR1、CXCR2 抗体を利用して、モルモット好中球遊走における CXCR1 と CXCR2 の機能分担を解明している。まず骨髄より分離した好中球に対する抗 gpCXCR1、抗 gpCXCR2 抗体の

結合を評価することで、モルモット好中球上に蛋白質として CXCR1 と CXCR2 が発現していることを初めて示した。また、gpIL-8 と gpGR0 α により好中球が容量依存的に遊走することを確認し、本遊走系において、抗 gpCXCR1、gpCXCR2 抗体の遊走阻害効果を評価することで、gpIL-8 による好中球の遊走は、gpCXCR1 と gpCXCR2 の両受容体により伝達されること、gpGR0 α による好中球の遊走は gpCXCR2 により伝達されることを明らかにした。このモルモット好中球遊走における CXCR1 と CXCR2 の機能分担はヒトと同様であり、炎症性疾患モデル動物としてのモルモットの有用性がより高められた。

第四章では、第二章、第三章で示された結果から、今後の展望について、入学後に学んだ、幅広知識を基に考察している。

審 査 の 要 旨

本論文では、著者が取得した抗 gpCXCR1 及び抗 gpCXCR2 抗体の有効利用の可能性を二点、提示した。一点目はモルモットを利用した炎症性疾患モデルにおける CXCR1、あるいは CXCR2 の機能的重要性の比較検討が両抗体によって可能になることであり、今後の炎症性疾患治療の開発に役立つことが期待できる。二点目として、両抗体により、好中球上の CXCR1 と CXCR2 の各蛋白発現量を検出することが可能となり、生体内での好中球遊走メカニズムにおける CXCR1 と CXCR2 の機能分担解明の進展が望まれると判断できる。

平成30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に論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（生物工学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。