

氏名（本籍）	永山（長谷川）	裕子	（富山県）
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博乙第	2964	号
学位授与年月	令和	2年	4月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	B系統細胞におけるDNAM-1の発現と機能		
主査	筑波大学教授	医学博士	野口 雅之
副査	筑波大学教授	医学博士	小島 寛
副査	筑波大学准教授	博士（薬学）	鈴木 裕之
副査	筑波大学講師	博士（医学）	甲斐 平康

論文の内容の要旨

永山裕子氏の博士学位論文は、B系統細胞におけるDNAM-1の発現と機能について検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

背景と目的：DNAM-1（CD226）は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜タンパクである。ヒト、マウスともにNK細胞、CD8⁺T細胞、CD4⁺T細胞、単球などの免疫細胞や血小板に高発現しており、細胞傷害活性の誘導やIFN- γ 等のサイトカイン産生亢進など活性化受容体として機能することが明らかとなっている。一方、B系統細胞においては、DNAM-1を発現している細胞が少数存在することが報告されている。しかし、B系統のどのサブセットがDNAM-1を発現しているのか、またその細胞上のDNAM-1はどのような機能を有するのか等、詳細はいまだ不明である。さらに最近、B細胞には無視できない数の血小板が結合していることが報告された。血小板にはDNAM-1が高発現しているため、これまで少数のB系統細胞で観察されていたDNAM-1の発現についても、その真偽が問われるようになった。これらのことから、著者は本研究においてB系統サブセットにおけるDNAM-1の発現様式と機能を明らかにする研究を行っている。

対象と方法：

(1) B系統サブセットにおけるDNAM-1の発現解析について

著者は、イメージングフローサイトメーターを用いて、血小板結合細胞を解析し、さらに、フローサイトメーターによるDNAM-1の発現解析を行っている。

(2) サイトカイン及び抗体産生解析について

著者は、末梢血単核球 (PBMC) より B 系統細胞を分離し、抗 DNAM-1 モノクローナル抗体、もしくはアイソタイプコントロール抗体でインキュベートしたのちに、CpG-ODN (TLR9 アゴニスト) の存在下、非存在下で培養上清中の IL-10 濃度をフローサイトメーターにより測定している。また、同条件で 7 日間培養後に培養上清中の IgM, IgG 濃度を ELISA 法で測定している。

結果：

(1) 血小板の B 系統細胞への結合について

著者はイメージフローサイトメーター解析により、ヒト末梢血の DNAM-1 を発現する CD19⁺B 系統細胞の約 10%が、DNAM-1 を発現する血小板に結合していることを明らかにしている。

さらに著者は、血小板のマーカーである CD41/61⁺細胞を用いて、血小板結合細胞除外前後でヒト CD19⁺B 系統細胞の DNAM-1 の発現を解析し、除去前に比較して除去後の解析では DNAM-1 陽性細胞率の低下傾向を認めているが、有意差には到達しなかった。次に著者は、CD27 と IgD を用いて各分化段階のサブセットに分け、血小板結合除去前後で DNAM-1 の発現を解析し、ヒト naïve B 細胞において血小板結合細胞除去による DNAM-1 の有意な発現低下を認めている一方、他の B 細胞サブセットではほとんど影響が認められないことを観察している。

(2) B 系統の細胞における DNAM-1 発現について

著者は、ヒト末梢血において血小板が結合した細胞を除去した上で B 系統細胞上の DNAM-1 の発現を解析し、naïve B 細胞、クラススイッチをしていない memory B 細胞では DNAM-1 の発現がほとんど認められない一方、クラススイッチした memory B 細胞、形質芽細胞、形質細胞では DNAM-1 が発現していることを明らかにしている。著者は同様にマウスの脾臓における B 系統細胞も血小板結合細胞を除去して解析した結果、B220⁺B 細胞及び形質芽細胞では DNAM-1 発現は認められなかったが、形質細胞上に DNAM-1 の発現することを確認している。

(3) ヒト CD19⁺B 系統細胞上の DNAM-1 の機能について

著者はさらに、CpG-ODN の刺激により DNAM-1 の発現が上昇した CD19⁺B 系統細胞を用いて IL-10 及び抗体産生における DNAM-1 の機能を解析している。その結果、抗 DNAM-1 中和抗体前処理をした細胞では、コントロールに比較して IL-10、IgM、IgG の産生が有意に減少することを示している。

考察：

本研究で、著者はヒト及びマウスの B 系統の細胞における DNAM-1 発現解析を行い、DNAM-1 は naïve B 細胞ではなく、クラススイッチした memory B 細胞、形質芽細胞や形質細胞などの分化した細胞に発現していることを示している。また、IL-10 及び抗体産生の解析より、CD19⁺B 系統細胞上の DNAM-1 が CpG-ODN 刺激後の IL-10 及び抗体産生を促進することが示唆されたと考察している。B 系統細胞により産生された IL-10 はオートクラインで memory B 細胞の IgM、IgG 分泌形質芽細胞への分化や IgG1 や IgG3 への免疫グロブリンのクラススイッチを誘導することが報告されている。また、CpG-ODN の刺激により形質芽細胞が IL-10 を産生することや IL-10 が B 細胞の生存や分化、抗体産生を促進することも報告されている。これらの結果と著者らの本研究によって、DNAM-1 は B 系統細胞の獲得免疫反応に関与する可能性が示唆されたと考察している。

結論：

1. 著者はヒト末梢血 B 系統細胞サブセットの中では形質芽細胞、形質細胞とクラススイッチした memory B 細胞に、マウスでは形質細胞に、DNAM-1 が発現していることを明らかにしている。
2. 著者はヒト B 系統細胞上の DNAM-1 が IL-10 及び抗体産生に関与している可能性があることを示している。

審査の結果の要旨

(批評)

本論文はヒト B 系統細胞における DNAM-1 の発現を初めて明らかにした貴重な論文と言える。著者はまた、その発現が B 細胞の分化段階によって異なることを明らかにし、最終的にはヒト B 細胞膜表面上の DNAM-1 が IL-10 の発現を亢進させ、抗体産生を促進させる可能性を示している。今後、B 系統細胞における DNAM-1 の機能を完全に解明するためにはさらなる解析が必要ではあるが、そのきっかけを作った優れた論文であると評価される。

令和2年2月21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、学力の確認を行った。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。