

	あ べ たかし
氏 名	阿 部 崇
学 位	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	新大院博(医)第43号
学位授与の日付	平成17年 3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博 士 論 文 名	シクロスポリン A による樹状細胞の IL-12 分泌誘導作用

論文審査委員	主査	教授	相 澤 義 房
	副査	教授	内 藤 眞
	副査	教授	安 保 徹

博士論文の要旨

緒言：樹状細胞は、細胞性免疫や腫瘍免疫の確立において中心的役割を担う細胞である。樹状細胞がリンパ節内で抗原をT細胞に提示すると、T細胞表面のCD40 リガンド (CD40L) の発現が亢進し、樹状細胞表面の CD40 と結合することにより、さらに樹状細胞上の CD40 の発現が亢進する。この CD40-CD40L の結合増強は、種々のシグナル伝達を介して樹状細胞における NF- κ B の持続的な核内移行、成熟、生存維持を惹起し、更に IL-12 の分泌を促す。分泌された IL-12 は Th1 や細胞障害性 T 細胞を誘導し、Th1 のインターフェロン γ 分泌を促進することが知られている。最近の研究で、CD40L 刺激による樹状細胞の IL-12 分泌が、カルシウムシグナルによって抑制されたと報告され、CD40 シグナルが細胞内カルシウムによって制御される可能性を示唆された。しかし、その詳細な機序についてはは未だ不明のままである。この機序を明らかにするために、今回我々は、p38MAP キナーゼに着目した。このキナーゼは、ヒト単球由来樹状細胞における CD40 シグナルカスケード上にあり、IL-12 分泌に必須のセリン/スレオニンキナーゼの一種である。このリン酸化に対する、カルシニューリン(カルシウム・カルモジュリン依存性セリン/スレオニン脱リン酸化酵素)阻害薬サイクロスポリン A (CyA), 及び Calcium ionophore である A23187 の影響を検討した。

材料と方法：ヒト単核球を比重遠心法で末梢血から分離し、磁気ビーズ法により NK, B, T 細胞を除去し、単球を分離した。これに macrophage-serum-free medium (SFM), GM-CSF 50ng/ml, recombinant human IL-4 5ng/ml を添加し、37°C で 2 日間培養して樹状細胞に分化誘導した。細胞内シグナル伝達の検討のために、①樹状細胞を培養液のみで処理、②CD40L 500ng/ml 3 時間刺激、③ 1 μ M CyA 30 分処理、④1 μ M CyA 30 分刺激後 200ng/ml A23187 10 分処理、⑤ 200ng/ml A23187 10 分処理、の 5 つの群に分け、各々37°C で incubate した。これらの細胞より p38MAPK を免疫沈降法で抽出し、SDS-PAGE ゲルを用いた電気

泳動で分離し、Western Blotting 後 anti-phospho-p38 MAPK antibody または anti-p38 MAPK antibody で標識した。樹状細胞による IL-12 の産生刺激は、37°C で①培養液のみ、②CD40L 500ng/ml 24 時間処理、③CyA 1 μ M 3 時間処理で行い、IL-12 p70 ELISA kit を用いて測定した。

結果：p38MAP キナーゼのリン酸化は、CD40L 刺激のみならず、CyA 処理でも認められ、IL-12 産生も CyA 処理した樹状細胞で認められた。また、CyA による p38MAP キナーゼのリン酸化は、A23187 添加によりキャンセルされた。すなわち CyA はカルシニューリンの抑制を介して p38MAP キナーゼリン酸化を促進し、ヒト単球由来樹状細胞の IL-12 分泌を引き起こす可能性が示唆された。

結論：CyA は T 細胞の増殖を抑制する免疫抑制剤として用いられているが、必ずしも Th1 分化と細胞障害性 T 細胞の誘導を抑制しておらず、むしろ促進的に作用し、樹状細胞を介した免疫反応に大きな影響を及ぼしていると考えられた。

審査結果の要旨

最近樹状細胞からの IL-12 分泌に細胞内カルシウムの影響が指摘されている。申請者はカルシニューリン阻害薬のサイクロスポリン A (CyA)、及び A23187 を用いて、P38MAPK のリン酸化と IL-12 の産生への影響を検討した。

ヒト末梢血から単球を分離後、37°C で 2 日間培養して樹状細胞を分化誘導して得た。検討は、①樹状細胞を培養液のみで処理、② CD40L(ligand) 500ng/ml で 3 時間刺激、③ 1 μ M CyA 30 分処理、④ 1 μ M CyA 30 分刺激後 200ng/ml の A23187 で 10 分処理、⑤ 200ng/ml の A23187 10 分処理、の 5 群で incubate した後、樹状細胞より p38MAPK を免疫沈降法で抽出し、抗体でリン酸化および非リン酸化 p38MAPK を測定した。p38MAPK のリン酸化は CD40L 刺激のみならず CyA 処理でも認められたが、CyA による p38MAPK のリン酸化は、A23187 添加により消失した。

樹状細胞の IL-12 の産生を、①培養液のみ、②CD40L 500ng/ml 24 時間処理、③CyA 1 μ M 3 時間処理群で、IL-12 p70 ELISA kit を用いて測定すると、CyA 処理樹状細胞でのみ IL-12 の産生を認めた。

CyA はヒト単球由来樹状細胞でカルシニューリンを抑制して p38MAPK リン酸化を促進し、IL-12 分泌を引き起こすと考えられた。これらを明らかにした点に学位論文としての価値を認める。