

(第 12 号様式)

学 位 論 文 の 要 約 (研 究 成 果 の ま と め)

氏 名 松本 卓也

学位論文名 C キナーゼ阻害剤を用いた安定性のあるヒト免疫寛容樹状細胞の作製

学位論文の要約

樹状細胞は抗原提示細胞として、獲得免疫として重要な役割を持つ一方で、同一抗原への無応答性すなわち免疫寛容も誘導できる。近年免疫寛容樹状細胞が注目されており、自己免疫、移植免疫において免疫寛容を導き、今後の細胞治療への応用が期待されている。免疫寛容樹状細胞の誘導には、IL-10, TGF- β , デキサメサゾン, ラパマイシンにより誘導されるが、いずれも一長一短があり、臨床的に有効かは不明である。そこで我々は、生理活性脂質, 核内受容体リガンド, キナーゼ阻害剤のライブラリーから免疫寛容樹状細胞の特徴である共刺激分子である CD80, CD86 の発現低下と IL-10 の産生増強を指標にスクリーニングを行い、C キナーゼ阻害剤(PKCI)を得た。PKCI にて誘導した樹状細胞(PKCI-DCs)の特徴とその臨床的有用性について検討した。

【方法と結果】健常人の末梢血より、CD14 陽性細胞を分離し、GM-CSF, IL-4 を加え、5 日間培養にて未熟樹状細胞(iDCs)を作成し、さらに 2 日間、TNF- α , IL-1 β , PGE2 の成熟誘導カクテルを加えて成熟樹状細胞(mDCs)を誘導した。その成熟過程においてPKCI (BisindolylmaleimideI, Gö6983, Ro32-0432)を加え、寛容型樹状細胞を誘導した。PKCI-DCsの特徴を以下に述べる。表面マーカーに関してはCD14, CD80, CD83, CD86, MHC class I の発現は低下していたが、CD1a, CD11c, MHC class II の発現は比較的保たれていた。また、CCR7 の発現も比較的高く、二次リンパ組織への遊走能は維持されていた。貪食能についてもFITC-dextranにて高く維持されていた。サイトカイン産生に関しては、IL-10 とTGF- β がmDCsと比較して著しく増加していた。さらに、PKCI-DCsによるT細胞の増殖抑制機能や制御性T細胞の誘導機能について検討した。ナイーブT細胞との 5 日間共培養にて、IL-10 産生CD4⁺T細胞とFoxp3⁺CD4⁺CD25⁺T細胞(Treg)の誘導について検討した。PKCI-DCsと共培養したT細胞は増殖能が低下しており、またIL-10, Foxp3 の発現細胞が有意に増加していた。PKCI-DCsのT細胞の増殖能は、共培養におい

て抗IL-10抗体、抗TGF- β 抗体を加えることで一部回復したが、不十分でtranswellの実験でさらに回復した。このことは、PKCI-DCsのT細胞抑制能はIL-10 およびTGF- β の産生だけでなく、Tregによる細胞接触が重要な役割を果たすことが明らかになった。また、PKCI-DCsの安定性を検討するために炎症状態において、表面マーカー、機能、サイトカインの産生について解析した。炎症刺激には、LPSまたはTNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ の炎症性サイトカインカクテルを用いた。その結果、PKCI-DCsの表現型は維持されており、IL-10 とTGF- β の産生も増加しており、T細胞の抑制能についても維持されていた。次にPKCIが免疫寛容樹状細胞を誘導する機序について解析した。DC上の共刺激分子の発現に転写因子NF κ B, IL-10 の発現にcAMP/CREBが重要な役割を演ずる。このために、PKCI存在下と非存在下でTNF- α , IL-1 β , PGE2 を加え、比較検討したところ、PKCI存在下ではNF κ Bの発現の低下と細胞内cAMPの上昇が認められ、これらの機序によって免疫寛容樹状細胞が誘導されることが明らかになった。さらに、*in vivo*において有効性を解析するために、マウスの骨髄から樹状細胞を誘導し、PKCIを加えマウスのPKCI-DCsを誘導した。マウスのPKCI-DCsはヒトと同様の表現型を示した。また、graft versus host diseaseのマウスモデルを作成し、iDCs, mDCs, PKCI-DCsを静脈注射し、生存率を比較したところPKCI-DCsを投与したマウス群において明らかな生存率の延長が認められ、*in vivo*においても有効性が示された。

【結論】iDCsにCキナーゼ阻害剤を加えて誘導した樹状細胞は、IL-10 とTGF- β の産生やTregを誘導させ、免疫寛容樹状細胞としての機能を持つことが示された。炎症環境下でも安定しており、*in vivo*においても有効性が示され、PKCI-DCsは、細胞治療において臨床応用出来得る可能性が示唆された。

なお、この学位論文の内容は、以下の原著論文に既に公表済である。

主論文：Protein kinase C inhibitor generates stable human tolerogenic dendritic cells.

Matsumoto T, Hasegawa H, Onishi S, Ishizaki J, Suemori K, Yasukawa M.

J Immunol. 2013 Sep 1;191(5):2247-57. DOI: 10.4049/jimmunol.1203053