

(第7号様式)

学位論文審査結果の要旨

氏名	松本卓也
審査委員	主査 小林 直人 副査 山下 政克 副査 渡部 昌平 副査 池田 宣央 副査 田中 亮裕

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

審査結果の要旨

【背景と目的】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法として報告されている方法には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 や 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。PKCIs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、培養下で未熟樹状細胞(iDCs)、さらに成熟樹状細胞(mDCs)を誘導し、その成熟過程においてPKCI(Bisindolylmaleimide I、Gö6983、Ro32-0432)を添加した。PKCI処理したDCsでは、表面マーカーのうち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。食食能についても高く維持されている事が示された。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、ナイーブ T 細胞との 5 日間共培養により、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 の発現細胞が増加していた。PKCI-DCs と共培養した T 細胞の増殖能は、抗 IL-10 抗体や抗 TGF- β 抗体を加えることで不完全に回復したが、細胞接触を阻害する transwell の実験でさらに回復した。すなわち、PKCI-DCs の T 細胞抑制能には 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 の炎症状態における安定性を解析したところ、PKCI-DCs の表現型や T 細胞の抑制能は維持されていた。次に PKCIs が免疫寛容樹状細胞を誘導する機序について解析した。DCs 上の共刺激分子の発現には転写因子 NF κ B、IL-10 の発現には cAMP/CREB がそれぞれ重要な役割を演ずる。PKCI 存在下と非存在下で比較検討したところ、PKCI 存在下では NF κ B の発現低下と細胞内 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。【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、免疫寛容樹状細胞としての機能を持つことが示された。この機能は炎症環境下でも安定しており、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。

申請者は、樹状細胞について研究の背景を概説した後、今回の実験の方法と結果について説明した。主論文に書かれた *in vitro* の実験データの他、査読者から求められている *in vivo* での追加実験の計画についても報告し、それらに基づいて今後の課題を含めて考察した。審査員からは、質・量ともにレベルの高い研究であるとの評価があった。引き続き質疑応答では、3 種類の PKCI のうちどれがもっとも良いのか [一種類に絞れてはいない、他の試薬を含めて至適濃度を定める必要がある]、PKCI のターゲットとなっている C キナーゼの種類は何か [ここではコンベンショナルな C キナーゼを阻害している、他のタイプを阻害するとアポトーシス等が起こってしまう]、追加実験の計画でヒトとマウスとで違いはあるか [免疫寛容樹状細胞が誘導できればどちらの系でも同じはずである]、どのような疾患の治療に応用することが考えられるか [抗原特異的な免疫寛容の誘導がメリットなので血管炎や Schögren 症候群などが考えられる]、臨床応用する場合に誘導された DCs の投与方法はどうするか [ヒトでは所属リンパ節への投与も考えられるが、まずはマウスの実験でリンパ節への移動も含めて確認したい]、臨床応用する場合に FCS は使用できないのではないか [ヒト血清を添加した培養系で確認する必要がある]、患者の DCs を用いた場合には機能に問題ないか [関節リウマチで DCs の機能異常が報告されており、重要な問題であると認識している]、などの質問に対し、申請者は自らの研究の限界を含めて明確に回答した [カッコ内が回答の内容]。

したがって、審査委員は本論文を高く評価し、全員一致して博士 (医学) の学位に値すると判断した。