

(第7号様式)

## 学位論文審査結果の要旨

| 氏名   | 姚立穎  |
|------|--|
| 審査委員 | 主査 山下 政克<br>副査 野元 正弘<br>副査 山田 武司<br>副査 羽藤 高明<br>副査 村上 正基 |

論文名

NAFLD モデルマウスにおける肝骨髄由来抑制細胞分画と免疫抑制機序の解析

審査結果の要旨

【緒言】非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）は、最も普遍的な肝疾患の1つで、その病態形成には免疫系の変化が密接に関与している。肝臓には多様な免疫担当細胞が存在しており、免疫活性化および免疫寛容を誘導する細胞群およびそのバランスにより恒常性が保たれていることが知られている。ミエロイド由来抑制性細胞（MDSCs）は、免疫抑制に働く不均一な細胞集団として報告されているが、肝臓におけるMDSCsの表現系は明確になっていない。そこで、今回申請者は、NAFLDモデルマウスである高脂肪食誘導肥満マウスを用いて、肝臓に存在するMDSCsの表現系とその性質について検討した。

【方法】NAFLDモデルマウスは、C57BL6マウスを高脂肪食で3ヶ月～12ヶ月飼育することで作製した。肝非実質細胞をフローサイトメトリーにより解析することで、MDSCsの表現系を解析した。SSC<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>dim</sup>およびSSC<sup>low</sup>CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>dim</sup>の細胞分画は、FACSソーティングにより分離した。MDSCsの免疫抑制能は、T細胞増殖、IFN- $\gamma$ 産生、iNOS発現とNO産生能を指標に検討した。*In vitro*ではMDSCs様細胞を、骨髄細胞をM-CSFで3日間培養することで誘導した。

【結果】肝臓に存在する単球様MDSCsの表現系はCD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>dim</sup>であったのに対し、顆粒球様MDSCsはCD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>high</sup>であった。CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>dim</sup>細胞は、さらにSSC<sup>high</sup>とSSC<sup>low</sup>に分画され、SSC<sup>low</sup>C

D11b<sup>+</sup>Gr1<sup>dim</sup> MDSCs が高脂肪食マウスの肝臓で経時的に増加していた。SSC<sup>low</sup>CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>dim</sup> 細胞は、Ly6C<sup>high</sup>、CCR2、CD115、CD274、F4/80、CD80 陽性であった。一方、SSC<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>dim</sup>細胞は、Ly6C<sup>low</sup>、F4/80、CD31 陽性であった。T 細胞機能抑制試験の結果から、SSC<sup>low</sup>CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>dim</sup>細胞は免疫抑制活性を有するのに対し、SSC<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>dim</sup>細胞は抑制活性を持たないことが分かった。SSC<sup>low</sup>CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>dim</sup>細胞の免疫抑制のメカニズムを解析した結果、iNOS によって産生される NO の関与が示された。それに加え、SSC<sup>low</sup>CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>dim</sup>細胞における iNOS の発現には T 細胞との共培養が必要であることが明らかとなった。また、NAFLD マウスにおいて SSC<sup>low</sup>CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>dim</sup>細胞は、脂肪酸の蓄積によって発現上昇する CCL2 によって遊走してくると考えられた。さらに、*in vitro* 分化誘導系を用いた解析から、M-CSF が、SSC<sup>low</sup>CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>dim</sup>細胞の分化誘導に関与している可能性が示された。

**【結論】** 本研究により、肝臓に存在する単球様 MDSCs は SSC<sup>low</sup>CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>dim</sup> の表現系を持ち、iNOS により産生される NO を介して、T 細胞機能を抑制することが初めて明らかとなった。この新規に同定された SSC<sup>low</sup>CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>dim</sup>細胞は、肝臓の免疫環境恒常性の維持に重要であり、NAFLD の病態制御に関与していると考えられた。

本論文では、マウス NAFLD モデルを用いて、肝臓に存在する新規単球様 MDSCs 細胞を同定したものであり、明瞭な結果とその意義について十分な考察が提示されている。公開審査会は、平成 28 年 1 月 12 日に開催され、申請者は英語で明確に発表を行なった。主査および副査により、1) この研究の一番の新しい点は何か、2) MDSCs の機能を抑制することが NAFLD を含む肝疾患の治療に有効と考えられるか、3) iNOS 発現誘導のメカニズムについてはどう考えるのか、4) SSC<sup>low</sup>CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>dim</sup>細胞は、CD4 T 細胞と CD8 T 細胞両方の機能を抑制できるのか、5) このマウス NAFLD モデルにおいて、血清中の肝障害マーカーの上昇は見られるのか、また、肝臓への T 細胞の集積は見られるのか、6) SSC<sup>low</sup>CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>dim</sup>細胞と SSC<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>dim</sup>細胞は、活性化状態や分化段階が違うだけなのではないか、7) IL-6 や IL-10 など、MDSCs の誘導を促進する既知の因子の関与はどうか、8) 臨床応用へ向けての問題点は何かなど、多方面からの試問が行われた。これらの質問に対し、申請者は質問の意図を十分に理解した上で、英語で詳細かつ的確に応答した。審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを確認し、本論文が学位授与に値すると全員一致で結論した。