

審査の結果の要旨

氏名 竹腰 知紀

本研究は樹状細胞の成熟過程において重要な役割を演じていると考えられる遺伝子を明らかにするため、パンニング法でランゲルハンス細胞を精製する系にて、精製したランゲルハンス細胞 (fLC) と培養したランゲルハンス細胞 (cLC) の mRNA の発現の差を PCR-Select Subtraction 法にて解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 精製直後の LC (fLC) と 48h 培養後の LC (cLC) の mRNA の発現の差を解析した結果を Clontech PCR-select cDNA subtraction 法にて検討し、fLC で 1 個、cLC で 2 個の新規の特異遺伝子を検出した。
2. 同定された遺伝子の中で、特にこれまでその機能が未知の蛋白質をコードしている遺伝子において最長の open reading frame をクローニングし、Gene A と名付けた。次に Gene A を pEGFP-C1 に組み込んだ vector (Gene A-pEGFP-C1 と名付けた) を作成し、FuGENE 6 を用いて HeLa 細胞に transfect した。EGFP の蛍光の分布から、Gene A の遺伝子産物である Protein A が細胞質に存在することが示唆された。

3. リンパ節、胸腺、脾臓の各リンパ臓器および脳、肝臓、腎臓における Gene A の発現を real-time PCR を用いて解析したところ、リンパ節において Gene A の有意に強い発現を認めた。胸腺、脾臓ではわずかに Gene A の発現がみられたものの、脳、肝臓、腎臓では Gene A の発現はみられなかった。さらに real-time PCR を用いて、成熟度の異なる樹状細胞 (dendritic cell; DC、bone marrow DC, 脾臓由来 CD11c⁺DC, LC) での Gene A の発現を比較検討したところ、いずれの DC においても成熟に伴い発現が増強する傾向がみられた。これらのことより、Gene A が樹状細胞において成熟に伴い発現が増強し、その傾向が生体内でもみられる可能性が示された。
4. Protein A に対する抗体(抗 Protein A 抗体)を作成し、抗 Protein A 抗体を用いた免疫染色による検討を行ったところ、LC と bone marrow DC では成熟に伴って染色の増強を認めた。これにより、樹状細胞の成熟に伴い Protein A の発現も増強することが示された。さらに、抗 Protein A 抗体をもちいた FACS では BMDC の成熟に伴う Protein A の増強は検出できなかったが、抗 Protein A 抗体と BD Cytotfix/Cytoperm kit を用いた BMDC の FACS では BMDC の成熟に伴う Protein A の増強が認められた。このことより、抗 Protein A 抗体が認識する部位は BMDC では細胞内に存在する可能性が示唆された。

以上、本論文はマウスランゲルハンス細胞において、成熟に伴い発現する新規分子の存在を確認した。この分子はランゲルハンス細胞のみならず、bone marrow DC、脾臓由来 CD11c⁺DC でも成熟に伴い発現の増強みられることが明らかにした。本研究は樹状細胞の成熟に関する新たな知見をもたらすものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。