

審査の結果の要旨

氏名　　葉野　嘉弘

本研究は皮膚免疫において中心的な役割を果たしているランゲルハンス細胞をはじめとした広範の樹状細胞に発現し、重要な役割を演じていると考えられる CD83 について詳細に検討したものであり、主に CD83 欠損マウスを用い解析を行い、下記の結果を得ている。

1. CD83 欠損マウスから単離された抗原提示細胞による MHC class II 分子発現をフローサイトメトリーにて評価したところ、CD83 欠損マウス由来の脾臓 B220 陽性 B 細胞、胸腺上皮細胞、脾臓樹状細胞、マクロファージでは、野生型同腹仔由来の細胞に比べて、細胞表面の MHC class II 分子発現がそれぞれ $50 \pm 2\%$ 、 $30 \pm 5\%$ 、 $25 \pm 3\%$ 、 $34 \pm 4\%$ 低下していることが示された。MHC class I 分子の発現についても測定したところ、これは野生型同腹仔由来の細胞と同等であることが示された。同様の結果は脾臓 B 細胞を LPS や F(ab')₂ 抗マウス IgM 抗体で刺激した場合にも示された。これに対して、細胞質における MHC class II 分子発現を測定したところ、CD83 欠損マウス由来の B 細胞と野生型同腹仔由来の B 細胞との間で大きな違いが無いことが示された。定量的 RT-PCR 法を用いて、CD83 欠損マウスからの B 細胞と野生型同腹仔からの B 細胞における MHC class II アルファ鎖と MHC class II ベータ鎖の mRNA の発現レベルも比較したところ、やはり有意な差が認められないことが示された。
2. シクロヘキサミドを加えた系において、MHC class II 分子発現を測定したところ、CD83 欠損 B220 陽性脾細胞では、野生型同腹仔由来の場合に比べ発現の著しい低下があることが示された。次に、単離した細胞表面の MHC class II 分子を無標識の抗体で飽和させた後、一定時間培養し、その後 PE 標識された抗 MHC class II 分子抗体で反応させることにより MHC class II 分子の turnover を測定したところ CD83 欠損 B220 陽性脾細胞において亢進していることが示された。これに対し MHC class II^{+/−}マウス由来の B 細胞においては亢進が無いことも示された。
3. 野生型同腹仔と CD83 欠損マウスとの脾細胞を、I-A^b 上の異なるエピトープを認識する抗 I-A^b 抗体で染色したところ、CD83 欠損マウス由来脾細胞における MFI 値の低下の度合いが同程度であることから、CD83 欠損マウスではペプチドの processing や loading が正常に起こっていること、および、CLIP の除去も正常に起こっており、細胞表面の MHC class II 分子ヘテロダイマーが、正常より高頻度に CLIP に占拠されている訳ではない事が示された。また、CD83 欠損マウス由来の MHC class II 分子を SDS-PAGE による電気泳動にて解析したところ、泳動速度の低下を認めなかつたことからも同様のことが示された。

4. 野生型同腹仔と CD8 3 欠損マウスとを交配することにより CD8 3 欠損 MHC class II^{+/−}マウスを作成し、その CD4 陽性細胞産生を検討したところ、胸腺においては CD8 3 欠損マウスとの間に有意な差を見いだせなかつたが、末梢においてはその産生細胞数が低下しており、MHC class II 分子が半減した程度では問題なく機能を発揮するという MHC class II 分子本来の正常な機能にとって、CD8 3 分子が必須の分子であることが示された。
5. CD8 3 欠損マウス由来 B 細胞と野生型同腹仔由来 B 細胞を単独で培養した場合と、それぞれを、CFSE で標識した野生型同腹仔由来 B 細胞、または CD8 3 欠損マウス由来 B 細胞と共に培養した場合において、MHC class II 分子発現を検討したところ、共培養において、その発現量は単独で培養した場合と変化しないことが示された。また、CFSE 染色した CD8 3 欠損マウス由来の脾細胞と野生型同腹仔由来の脾細胞を、レシピエントの CD8 3 欠損マウスおよび野生型同腹仔に静脈内注射し、一週間後、これらの細胞を回収し、その MHC class II 分子発現を検討したところ、レシピエントマウスの遺伝子型は、移入されたレシピエント CD8 3 欠損マウス由来 B 細胞の MHC class II 分子発現に有意な影響を与えるなかった事から、CD8 3 欠損マウス由来 B 細胞の MHC class II turnover の亢進は個々の細胞自体に備わっている内在性の因子によるものである事が示された。
6. CD8 3 欠損マウス由来 B 細胞を LPS や F(ab')₂ 抗マウス IgM 抗体で刺激し、CD8 6、CD6 9、ICAM-1 分子、CD4 4 分子発現をフローサイトメトリーにて評価したところ、CD8 3 欠損マウス由来 B 細胞において CD8 6 発現のみ低下しており、CD6 9、ICAM-1 分子、CD4 4 分子発現は問題なく、活性化は問題なく起きていることが示された。CD8 3 欠損マウス由来 B 細胞における [Ca²⁺] の変化や NFkB の活性化、ERK の活性化を測定したところ、正常だったため、CD8 3 欠損マウス由来 B 細胞における MHC class II 分子発現の減少はシグナル伝達の障害が原因ではない事が示された。

以上、本論文は CD8 3 欠損マウス及び CD8 3 欠損マウス由来 B 細胞を用いた解析から、CD8 3 の持つ、これまで未知だった turnover 亢進を介する MHC class II 分子発現制御機構を明らかにした。本研究は、CD8 3 の免疫系における複雑な役割の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。