

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 菅 又 龍 一

増養殖現場で大きな問題となっている魚病に対処するためにワクチンが多用されるが、その効力を高めるためには、魚類の免疫系に関する深い理解が必須である。そうした中で、最初に病原生物を取り込み、その抗原情報を T 細胞に提示する抗原提示細胞という、いわば免疫応答の出発点を魚類で初めて明らかにしたのが本研究である。

哺乳動物では、単球や樹状細胞といった抗原提示細胞が、生体内に侵入した病原生物を細胞内に取り込み、消化したペプチド断片を結合させた MHC クラス II 分子を細胞表面に提示し、ヘルパー T 細胞 (Th 細胞) にその情報を伝える。Th 細胞がそれを異物として認識すると、B 細胞に特異的な抗体を産生させるようになり、獲得免疫応答が誘導される。抗原提示細胞はこの MHC クラス II 分子と、T 細胞の活性を制御する共刺激分子によって特徴付けられる。この抗原提示細胞の解明は魚類免疫学の大きな課題であったが、本論文は、ゲノムデータベースの利用が可能なトラフグを材料に共刺激分子 B7 ファミリーを指標に検討することで、抗原提示細胞の存在を魚類で初めて明らかにし、さらにその機能の一端を明らかにしたものである。

第 1 章では抗原提示細胞マーカー遺伝子の構造と、発現解析を記している。

ヒトやマウスの抗原提示細胞は、MHC クラス II や、共刺激分子である B7 や CD40 を細胞膜上に共発現している。トラフグゲノムデータベースから検索し、B7-H1/DC, B7-H3, B7-H4, CD40 や、より強力な抗原提示能を持つ樹状細胞のマーカーである DEC-205, CD83, CD11 の一次構造を決定している。RT-PCR 法により、胸腺、頭腎、体腎、脾臓などのリンパ器官や、皮膚や腸などの粘膜組織に抗原提示細胞が分布するものと推定している。

第 2 章では B7 ファミリー発現細胞の同定と、機能解析を記している。

B7 ファミリー分子を発現する細胞を同定するために、まずトラフグの 3 種類の B7 とヒト IgG1 の Fc 領域とを連結させた Fc 融合組換え体 (B7-H1/DC-Ig, B7-H3-Ig, B7-H4-Ig) を、昆虫細胞により作製し、ラット抗トラフグ B7-Ig 血清も得ている。FACS 解析により、B7 タンパク質が Lipopolysaccharide (LPS) で刺激した単球の細胞膜上に誘導されることを明らかにし、さらに Magnetic beads cell sorting (MACS) 法により各 B7⁺単球を単離し、これらの細胞が抗原提示に必要な MHC クラス II α 遺伝子や、CD8 α , DEC-205, CD83 などの樹状細胞マーカーを発現していることを示している。続いて、末梢血白血球から単離した T 細胞に B7-Ig を作用させて FACS 解析を行うことにより、3 種類の B7-Ig は phytohaemagglutinin (PHA) で活性化した T 細胞上に結合することが明らかにしている。次に B7-Ig による PHA 刺激 T 細胞の増殖活性やサイトカイン産生能を解析することにより、B7-H1/DC は T 細胞の増殖を抑制するとともに、IL-10 と 2 つの IFN- γ の発現を促進するこ

と、逆に B7-H3 と B7-H4 は T 細胞の増殖を促進するとともに、IL-2 の発現を促進し、IL-10 の発現を抑制することを見出し、B7 分子内での T 細胞に対する機能の多様性を観察している。このように B7 は魚類においても T 細胞の増殖やサイトカイン産生能を制御する共刺激分子であることが示され、ここに魚類で初めてとなる抗原提示細胞の特定に至っている。

第 3 章では、CD8 α を発現する抗原提示細胞の機能を論じている。

哺乳類では一部の樹状細胞 (DC) が、CD8 α を発現することから、CD8 α ⁺単球について、最も強い抗原提示力をもつ樹状細胞の候補としての機能を検討している。単球を LPS 刺激した後、ラット抗トラフグ CD8 α 血清を用いて、CD8 α ⁺細胞と CD8 α ⁻細胞とを分離し、両集団はともに MHC クラス II α と B7 や CD40 遺伝子を発現しているが、CD8 α ⁺細胞ではさらに CD83 や DEC-205 といった樹状細胞マーカーを発現していることを示している。そして同種異系 T 細胞との混合白血球反応により、CD8 α ⁺DC 様細胞と CD8 α ⁻単球はともに、MHC クラス II 不適合で起こる模擬的な抗原提示によって、同種異系 T 細胞増殖を誘導したことから、これらの細胞が T 細胞に対して抗原提示と共刺激をおこなうトラフグの抗原提示細胞であると結論している。さらに CD8 α ⁺DC 様細胞は、CD8 α ⁻単球よりも強く T 細胞増殖を促進したことから、哺乳類における知見と同様に、この細胞が単球よりも強い抗原提示能を引き起こすことのできる樹状細胞サブセットの一つであるものと推定している。

以上、本研究により、抗原提示細胞という免疫応答の出発点となる重要な細胞が魚類で初めて発見され、その主要な機能もほぼ解明された。さらには CD8 α ⁺単球という謎の存在についての樹状細胞としての可能性も示している。従来の T 細胞や B 細胞に関する研究の蓄積に、獲得免疫系の起点に関する理解を深めた本研究が加わることにより、魚類免疫系の全体像が大きく広がった。このことは免疫増強や、ワクチンの有効性の向上という増養殖産業からの要求解決に資するものであり、今後は応用的側面からの研究への貢献が大いに期待されるところである。よって、審査委員一同、博士 (農学) の学位を授与するに値するものと認めた。