

[課程—2]

審査の結果の要旨

氏名 内田 優輝

本研究は、自己免疫疾患の病態形成に関与する自己反応性CD4陽性T細胞を同定・解析するため、MHCクラスIIテトラマーを調製することを目的とし、哺乳類細胞（マウス線維芽細胞）を発現系として組換えMHCクラスIIタンパク質（DRA\*01:01/DRB1\*04:06, DR04:06）を作製したもので、下記の結果を得ている。

1. レトロウイルスベクターを用いて、組換えDR04:06遺伝子をマウス線維芽細胞（NIH3T3）に導入し、可溶性組換えDR04:06タンパク質の安定発現株（NIH-DR0406細胞）を樹立した。組換えDR04:06タンパク質の分泌量を増強するため、レトロウイルス由来のプロモーターを活性化する酪酸ナトリウムおよびデキサメタゾンでNIH-DR0406細胞を処理した。その結果、10 mM酪酸ナトリウム、1  $\mu$ Mデキサメタゾンで72時間処理することにより、組換えDR04:06タンパク質の分泌量は約31 – 45倍に上昇した。
2. 高密度細胞培養システムを用いてNIH-DR0406細胞を大量培養し、酪酸ナトリウムおよびデキサメタゾン処理と組合せ、組換えDR04:06タンパク質の分泌量上昇を試みた。ELISAによりDR04:06タンパク質の分泌量を定量した結果、NIH-DR0406細胞は昆虫細胞発現系と同程度あるいはそれ以上の組換えDR04:06タンパク質（1.8 mg/l）を分泌していることが示された。
3. 培養上清からの組換えDR04:06タンパク質精製条件を検討した。その結果、Co<sup>2+</sup>アフィニティークロマトグラフィーおよび抗Hisタグ抗体アフィニティークロマトグラフィーにより、~70%精製度の組換えDR04:06タンパク質を89  $\mu$ g得た。
4. 発現した組換えDR04:06タンパク質の、ヒトインスリン $\alpha$ 鎖ペプチド（InsA<sub>8-17</sub>）に対する結合能を評価した。その結果、InsA<sub>8-17</sub>ペプチドは組換えDR04:06タンパク質に特異的に結合することが示された。

以上、本論文では哺乳類細胞を用いて組換え MHC クラス II タンパク質大量発現系を構築し、発現した組換え MHC クラス II タンパク質がペプチド結合能を持つことを示した。本研究で構築された発現系を用いて MHC クラス II テトラマーを調製し、自己反応性 CD4 陽性 T 細胞のより正確な同定・解析や、自己抗原エピトープのスクリーニングに応用することで、発症機序が未知である自己免疫疾患の病態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。