

医石研 第357号

(別紙様式第3号)

論 文 要 旨


論 文 題 目

Impairment of *in vitro* generation of monocyte-derived human dendritic cells by inactivated HIV-1

: involvement of type-I interferon produced from plasmacytoid dendritic cells

(不活化 HIV-1 による単球由来樹状細胞の *in vitro* での分化阻害

: 形質細胞様樹状細胞から産生される 1 型インターフェロンの関与)

氏 名 児 玉 晃 

論文要旨

[背景] 後天性免疫応答の誘導や維持には抗原提示細胞である樹状細胞(DC)が大きな役割を果たしている。免疫調節性DCには骨髓系DC(mDC)と形質細胞様DC(pDC)が知られる。T細胞免疫賦活能が高いmDCは単球を試験管内で分化させて作ることができるようになった。しかし、インターフェロン α と β (I-IFN)産生能を有するpDCの培養は未だ不可能である。近年、培養mDCを目的とする抗原を感作させて人体に戻すことにより微弱な免疫応答を増幅する方法が癌治療等で試みられている。HIV-1感染者では末梢血DCの数と機能の低下が認められHIV-1に対する防御的免疫応答の不完全性との関連性が示唆されている。一般にmDCは末梢血単核球(PBMC)中に10%程度の割合で含まれる単球をさらに分離精製して培養されているが、より簡便で効率のよい方法の工夫と開発が望まれている。

[目的] mDC培養方法の簡素化を図るため、未精製のPBMCを用いることできるかを検討し、さらにHIV-1特異的な免疫応答の誘導のために、DCの不活化HIV-1抗原での感作条件の最適化を検討することを目的に研究を始めた。ところが、研究中にHIV-1

に暴露する時期が早いと PBMC からの mDC 分化が阻害されるという興味ある事実を見いだした。そこで、そのメカニズムと対応策も併せて研究することを最終目的とした。

〔方法〕 健常人由来新鮮 PBMC および精製単球を GM-CSF と IL-4 を含む培地で培養し、mDC への分化の成否を細胞表現形と機能（T 細胞活性化能）を比較した。HIV-1 は AT-2 薬剤で化学的に不活化して用いた。使用した抗体やサイトカインおよび定量キットは市販のものを用いた。

〔結果〕 (1) 表現形と機能から判断すると、精製単球の場合と同様に PBMC からでも mDC 細胞が分化誘導された。(2) PBMC と単球の培養系を培養初日から不活化 HIV-1 で感作すると HIV-1 量依存的に PBMC 培養でのみ培養早期に単球のアポトーシスが生じ、5 日目の DC の収量は PBMC 非暴露コントロールに比較して 1/2 以下に低下した。(3) 同様な mDC の分化阻害は、PBMC でも精製単球培養でも I-IFN や TLR-3 のアゴニストである poly I:C の添加で観察された。(4) この mDC 分化阻害は I-IFN の受容体に対する阻止抗体で解除された。(5) HIV-1 に暴露された PBMC は IFN- α を産生し、その産生と mDC 分化阻害は PBMC から




CD123+細胞（主に pDC）を除去することにより解除された。(6)不活化 HIV-1 による mDC の分化阻害は抗 CD4 抗体により解除された。(7)興味あることに TNF は HIV-1 や poly I:C による PBMC からの DC 分化抑制を解除した。

〔結論〕以上の結果から、未精製 PBMC からでも精製単球からと同様に T 細胞刺激活性を有する機能的 mDC が分化誘導できることが証明された。しかし、分化培養の初期に HIV-1 に暴露すると PBMC 中の pDC が CD4 依存的に産生する IFN- α により DC 分化が阻害されることも明らかとなった。本研究成果は、今後、種々の疾病に対する DC 免疫療法を目的とする mDC 分化培養法の簡素化と改良に役立つと期待される。特に HIV-1 感染者からの mDC 培養には重要なポイントを示している。

(1161 字)

(別紙様式第7号)

論文審査結果の要旨

報告番号	* 課程博 論文博	第357号	氏名	児玉 晃
		平成22年3月23日		
論文審査委員	主査教授	松崎 吾朗		
	副査教授	藤田 次郎		
	副査教授	森 直樹		
(論文題目)				
Impairment of in vitro generation of monocyte-derived human dendritic cells by inactivated HIV-1: involvement of type-I interferon produced by plasmacytoid dendritic cells. (不活化 HIV-1 による単球由来樹上細胞の in vitro での分化阻害: 形質細胞様樹状細胞から産生される I 型インターフェロンの関与)				
(論文審査結果の要旨)				
<p>1. 研究の背景と目的: 樹状細胞は T 細胞免疫応答を制御する重要な抗原提示細胞であり、HIV-1 を含む多くの感染症に対するワクチンへの応用が期待される。本研究では、ヒト末梢血をサイトカイン(顆粒球・単球コロニー形成因子およびインターロイキン-4)とともに in vitro 培養することによる簡便な樹状細胞分化誘導方法を検討した。また、末梢血単核球を用いた樹状細胞分化に対する不活化 HIV-1 添加の影響を検討した。</p> <p>2. 研究結果: ヒト末梢血単核球を顆粒球・単球コロニー形成因子およびインターロイキン-4 とともに培養することにより樹状細胞が分化し、その効率は、これまで使われていた精製末梢血単球を用いる方法と同等であった。一方、末梢血単核球を用いた樹状細胞分化培養に不活化 HIV-1 を添加すると、単球のアポトーシス誘導に伴う樹状細胞分化の阻害が認められた。この不活化 HIV-1 による樹状細胞分化阻害は、形質細胞様樹状細胞が産生する I 型インターフェロン、特にインターフェロン-α に依存しており、また抗 CD4 抗体を培養に添加することにより解除された。同様の樹状細胞誘導阻害は、培養中に I 型インターフェロンあるいは I 型インターフェロンを誘導する TLR-3 アゴニストである Poly I:C を添加によっても認められた。一方、アポトーシスを誘導する分子として知られる腫瘍壊死因子、FasL 等は不活化 HIV-1 による樹状細胞誘導阻害に関与せず、逆に腫瘍壊死因子は不活化 HIV-1 による樹状細胞誘導阻害を解除した。</p> <p>3. 研究の意義と学術的水準: 以上の結果から、ヒト末梢血単核球を用いた簡便な樹状細胞誘導法が確立するとともに、不活化 HIV-1 がこの樹状細胞分化を阻害することが明らかとなった、この阻害機構および解除方法も明確に示された。これは、今後の樹状細胞を応用した免疫療法を開発するうえで重要な知見である。以上の結果から、本論文は学位授与に十分値するものと判断した。</p>				

備考 1 用紙の企画は A4 とし縦にして左横書きとすること。

2 要旨は 800~1200 字以内にまとめること。

3 *印は記入しないこと。