

氏名(本籍) 馬場 弘道(滋賀県)

学位の種類 博士(医学)

学位記番号 博士第500号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与年月日 平成17年3月25日

学位論文題目 B1-B cells are the main antigen presenting cells in CpG-oligodeoxynucleotides-stimulated peritoneal exudate cells

(CpG-oligodeoxynucleotides刺激された腹腔浸出細胞において主な抗原提示細胞はB1-B細胞である)

審査委員 主査 教授 服部 隆則

副査 教授 田中 俊宏

副査 教授 大久保 岩男

## 論文内容要旨

※整理番号	504	(ふりがな) 氏名	ばまば ひろみち 馬場 弘道
学位論文題目	B1-B cells are the main antigen presenting cells in CpG-oligodeoxynucleotides-stimulated peritoneal exudate cells (CpG-oligodeoxynucleotides 刺激された腹腔浸出細胞において主な抗原提示細胞は B1-B 細胞である)		
<p>〔目的〕 樹状細胞やマクロファージ(MΦ)と言われる抗原提示細胞(APC)は、抗原特異的な細胞性免疫や体液性免疫を制御する helper T 細胞を活性化すると言われている。一方、腹腔浸出細胞 (PEC) も以前より MΦとして扱われてきた。しかし、PEC を詳細に解析すると、MΦだけでなく B1-B 細胞もかなりの割合で存在することが明らかとなった。刺激の種類により APC の特性に違いが出る事実が以前より指摘されており、今回我々は PEC の主な構成をなす MΦ、B1-B 細胞について以下の 2 種の刺激を用いて比較検討を行った。ひとつは感染微生物からの刺激として CpG-oligodeoxynucleotides(CpG-ODN)、もうひとつは T 細胞による活性化を想定して刺激性抗 CD40 抗体(<math>\alpha</math>CD40Ab)を用いた。</p> <p>〔方法〕 Female C3H/CaN, BALB/c, C57BL/6 mice(8-12 週)の PEC を実験に用いた。1) PEC の主要構成細胞である MΦ、B1-B 細胞の表現型を調べるため CD11b(Mac-1)の発現量によりフローサイトメーター(FACS)で sorting し、表現型(IgM,CD5,F4/80 etc)を FACS を用いて検討した。また、蛍光マイクロビーズを用いて各々の細胞の貪食能を検討した。2) T 細胞の活性化には、T 細胞レセプターが APC 上のペプチド抗原 MHC 分子複合体と結合すること、及び抗原提示細胞からの補助刺激シグナルが必要である。そこで B1-B 細胞と MΦを CpG-ODN か <math>\alpha</math>CD40Ab で 24 時間刺激し、APC の補助刺激分子である CD86 や MHC class II の発現の時間経過を FACS を用いて検討した。また、HEL 蛋白と 24 時間共培養し、HEL-peptide が結合した MHC class II の発現を FACS を用いて検討した。3) 次に B1-B 細胞と MΦを CpG-ODN もしくは <math>\alpha</math>CD40Ab で刺激後 0-6 時間、21-27 時間で上清回収し、免疫賦活作用のある IL-12p40 と免疫抑制作用のある IL-10 を ELISA で検討した。4) <i>in vitro</i> での抗原特異的な helper T 細胞活性化能をみるため、CpG-ODN 刺激で活性化された B1-B 細胞と MΦを種々の濃度の OVA-peptide、OVA-specific TCR transgenic mice の T 細胞と共培養し、<math>^3</math>H-thymidine による T 細胞増殖反応試験にて検討した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

〔結果〕 1) FACS scan 上相対的に forward-scatter(FSC)が高く side-scatter(SSC)が低い集団は、CD11b low, surface-IgM high, CD5 positive の表現型により B1-B 細胞と考えられた。また、相対的に SSC の高い集団は、CD11b high, F4/80 positive などの表現型より MΦと考えられた。さらに、貪食能については SSC の高いほうが強く、この集団が MΦであることが確認された。2) CD86 発現は B1-B 細胞では CpG-ODN 刺激にて増強するが、MΦでは CpG-ODN 刺激に依存しない増強を認めた。また、MHC class II の発現も B1-B 細胞では CpG-ODN 刺激にて増強するが、MΦでは刺激に関係なくほとんど認められなかった。HEL-peptide が結合した MHC-class II の発現でも同様であった。以上のことより、B1-B 細胞は helper T 細胞活性化能を有する可能性が示唆された。一方、MΦは補助刺激分子である CD86 は発現するが MHC 抗原ペプチド複合体の出現がほとんど認められなく、T 細胞活性化能をほとんど有さないことが示唆された。3) 免疫賦活作用のある IL-12p40 と免疫抑制作用のある IL-10 の産生量を見てみると、B1-B 細胞では  $\alpha$ CD40Ab 刺激に比べて CpG-ODN 刺激のほうが多量の IL-10 産生を認めた。一方 IL-12p40 ではどちらの刺激でも産生量が増加した。MΦでは刺激に無関係に IL-12p40, IL-10 産生が 0-6 時間で認められた。また、CpG-ODN 刺激された MΦのみにおいて IL-12p40 産生が遷延した。以上のことより、CpG-ODN 刺激に依存して MΦは主に IL-12 を産生し、B1-B 細胞は主に IL-10 を産生することが示唆された。

4) OVA-peptide 濃度依存性の抗原特異的な helper T 細胞の増殖は、MΦよりも B1-B 細胞を APC とした方がより強く誘導された。以上より、B1-B 細胞は免疫抑制性サイトカイン産生するにもかかわらず、PEC での主要な抗原提示細胞であることが示唆された。

〔考察〕 長い間 T 細胞反応を引き起こす APC として、PEC は腹腔 MΦと考えられてきた。しかし、いまだに PEC のどの細胞が APC として働いているか不明である。我々は、PEC の 20-30%構成するにもかかわらずいままで APC としての機能がはっきりしていない B1-B 細胞と約 40%構成する MΦを単離して、CpG-ODN 刺激後の APC としての機能を比較検討した。B1-B 細胞は、CpG-ODN 刺激にて CD86、MHC-class II 発現の増強が認められた。さらに、蛋白を取り込み peptide にして MHC-class II 分子とともに抗原特異的な helper T 細胞への抗原提示が可能であった。ところで、多量の IL-10 存在下で CD4 T 細胞が免疫抑制的に働く Tr-1 細胞へ分化するとの報告があり、CpG-ODN 刺激された B1-B 細胞でも抗原特異的な Tr-1 細胞を誘導可能と考えられる。今後検討する必要がある。

MΦの CD86 の発現やサイトカイン産生は、plating による機械的刺激の影響を強く受けた。また、MΦは B1-B 細胞と比較して貪食能が強く IL-12 産生量も多いが、ほとんど抗原提示がおこなわれなかった。このことより、腹腔 MΦは比較的大きな抗原を消化し、メカニズムはわからないがそれを B1-B 細胞に輸送することと IL-12 の供給により、間接的に抗原提示に関与している可能性も考えられた。

以上のことより PEC における CpG-ODN 刺激による主な APC は B1-B 細胞であることが示唆された。APC はいろいろな免疫反応(自己免疫、アレルギーなど)を制御する可能性があり、今後抗原依存性の免疫反応を理解するためにいろいろな APC を解析する必要がある。

〔結語〕 CpG-ODN 刺激された PEC では B1-B 細胞が主な抗原提示細胞であることが考えられた。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	504	氏名	馬場 弘道
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>腹腔浸出細胞(PEC)は以前より抗原提示細胞の 1 つであるマクロファージとして扱われており、詳細な研究は少なかった。本研究では、PEC の約 40%をなすマクロファージと約 25%をなす B1-B 細胞を単離して、CpG-ODN(oligodeoxynucleotides)と抗 CD40 抗体の刺激によって誘発される抗原提示特性の違いについて検討した。</p> <p>その結果、1) マクロファージでは helper T 細胞活性化能をほとんど有しないに対し、B1-B 細胞は helper T 細胞活性化能を有すること、2) マクロファージは主に免疫賦活作用のある IL-12 を産生するのに対し、B1-B 細胞は CpG-ODN 刺激に依存して主に免疫抑制作用のある IL-10 を産生することがわかった。以上のことより、B1-B 細胞は免疫抑制性サイトカイン産生するにもかかわらず、PEC での主要な抗原提示細胞はマクロファージではなく、B1-B 細胞であることを明らかにした。</p> <p>これらの研究成果は、PEC の抗原提示細胞について重要な知見を与えたものであり、博士(医学)の学位論文に値するものである。</p>			
(平成 17 年 2 月 15 日)			