

氏名	小川 紗也香		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	工学		
学位授与番号	博甲第	5977	号
学位授与の日付	平成31年 3月25日		
学位授与の要件	自然科学研究科 生命医用工学 専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	濾胞樹状細胞が産生する IL-34 による胚中心反応の制御に関する研究		
論文審査委員	教授 徳光 浩	教授 大槻 高史	教授 井出 徹
学位論文内容の要旨			
<p>抗原により活性化した B 細胞は、T 細胞や濾胞樹状細胞 (FDC) からの刺激を受け、高親和性抗体産生 B 細胞への分化に重要な環境である胚中心を形成する。当研究室では、胚中心における FDC の役割を解明するため、マウス FDC 株 FL-Y を樹立した (<i>J. Immunol.</i> 2006)。さらに、FL-Y が、胚中心反応に関与する可能性をもつ新規単球系細胞 : FDMC (FDC-induced monocytic cell) の分化を誘導することを発見した (<i>J. Leukoc. Biol.</i> 2014)。また、FDMC の分化には FL-Y の発現する IL-34 による、FDMC 前駆細胞の発現する Colony stimulating factor-1 受容体 (CSF-1R) のシグナル伝達の活性化が重要であることも明らかにした。</p> <p>本研究では、①FDMC の分化に関与する IL-34 の分子機構を明らかにすること ②FL-Y 細胞表面への IL-34 の発現制御機構を解明すること ③生体内での IL-34 の免疫学的機能を明確にすることを目的とした。</p> <p>① IL-34 の細胞表面への発現</p> <p>タンパク質分泌を阻害した条件下でも FDMC は分化誘導され、この分化誘導効率は IL-34 の発現量に依存することを発見した。この結果は、FDMC の分化には FL-Y 細胞表面に発現する IL-34 が必要であることを示すものであり、IL-34 の細胞表面発現をフローサイトメーターを用いて確認した。</p> <p>② FDC 細胞表面への IL-34 発現制御機構の解析</p> <p>N 末端に Strep tag を付加した IL-34 (IL-34-Nst) を発現する FL-Y IL-34-Nst を樹立した。次に、FL-Y IL-34-Nst の細胞膜画分において IL-34 と結合する分子を質量分析法により同定し、分子シャペロンタンパクの一種である GRP78 (78 kDa glucose-regulated protein) を見出した。実際に、ウエスタンブロット法により細胞膜画分における IL-34-Nst と GRP78 との結合が検出でき、FL-Y 細胞表面において IL-34 と GRP78 が結合していることが明らかとなった。次いで、GRP78 をヘテロ欠損した FL-Y GRP78^{-/-} を樹立した。FL-Y GRP78^{-/-} 細胞では、細胞表面の IL-34 発現量とともに、FDMC の分化誘導能力も低下していた。これらの結果は、FL-Y において GRP78 が IL-34 の細胞表面発現を制御することを示すものである。</p> <p>② 生体内における IL-34 の胚中心反応への関与</p> <p>生体内での FDMC 様細胞の存在を解析するため、WT と IL-34 欠損マウスに抗原を免疫し、脾臓細胞中の FDMC 様細胞の割合をフローサイトメーターにより解析した。その結果から、IL-34 欠損マウスにおいて、FDMC 様細胞 (CSF-1R⁺ CD11b⁺) の割合が減少していた。その際、IL-34 欠損マウスにおいて、血清中の抗原特異的 IgG1 抗体価も低下していた。これらの結果より、生体内においても IL-34 は、単球系細胞の分化誘導を介して抗体の親和性成熟機構に関与していることが示唆された。</p>			

論文審査結果の要旨

免疫反応において体内に侵入した病原体（抗原）を認識した B 細胞は、リンパ組織内で活性化し濾胞樹状細胞（FDC）とともに胚中心と呼ばれる微小環境を形成する。胚中心における B 細胞はまず暗領域を形成し、急激に増殖すると共に、自身の抗体分子を多様化する。その後、明領域に移行し、抗原に対し高親和性抗体を獲得した B 細胞のみが FDC や濾胞ヘルパー T 細胞との相互作用によりクローン選択され、形質細胞や記憶細胞へと分化することが明らかとなっているが、その詳細な分子機構は不明である。本学位論文において、FDC の機能解析を目的として樹立したマウス FDC 株 FL-Y を用いて、FL-Y が新規な単球系細胞、FDMC (FDC-induced monocytic cell) の分化を誘導するメカニズムについて以下の点を明らかにした。①FDMC の分化には、FL-Y の産生する Interleukin 34 (IL-34) が FDMC 前駆細胞上に発現する Colony stimulating factor-1 receptor (CSF-1R) に結合し、シグナル伝達を活性化することが必須であること。②FDMC の分化制御には FDC 細胞膜表面に発現する IL-34 が必要であること。③細胞表面における IL-34 結合分子を探索したところ、IL-34 結合分子の一つとして、タンパク質の糖鎖修飾やリフォールディングを制御する分子シャペロン的一种である 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78) を同定し、その結合性を確認した。④CRISPER/Cas9 システムを用いて、*Grp78* 遺伝子をヘテロノックアウトした FL-Y (FL-Y GRP78^{+/-}) は FDMC の分化誘導能力も低下していた。⑤生体内における FDMC の存在および胚中心反応への関与を明らかにするため、IL-34 ノックアウト (KO) マウスを用いて解析したところ、生体内においても IL-34 依存的に発生する FDMC 様細胞の存在が示唆されるとともに、抗 TNP IgG1 抗体価の低下が見られた。これらの研究結果から、生体内において IL-34 依存的に分化する FDMC 様細胞の胚中心反応への関与が明らかとなった。

これらの研究成果は免疫学領域における新しい B 細胞分化のメカニズムの解明に繋がるものであると認められ、学位審査委員の全員が本論文を学位にふさわしい論文であると評価した。