

論文要旨

Reactive oxygen species are essential mediators in antigen presentation by Kupffer cells

活性酸素はクッパー細胞の抗原提示機能に
必須のメディエーターである

前村 公成

【 目的 】

クッパー細胞は門脈を通じて肝に侵入する抗原を排除するために、肝内の抗原提示細胞として重要な役割を果たしている。クッパー細胞の抗原提示は局所および全身の免疫応答制御に関与していると考えられている。本研究の目的は、クッパー細胞の抗原提示の過程に発生する細胞内活性酸素の役割を明らかにすることにある。

【 方法 】

1. 実験動物はオスの Lewis ラットを使用した。
2. クッパー細胞の分離: 0.05% type IV コラゲナーゼによる門脈環流後、摘出した肝組織を攪拌で分解した。さらに遠沈と Percoll を用いた比重分離法にて得られた細胞塊から、培養器に対する選択的接着能を有する細胞集団をクッパー細胞として分離した。細胞の純度は 90%、viability は 95%であった。
3. クッパー細胞の前処理: 阻害実験では、以下の薬剤を単層培養したクッパー細胞に細胞外投与で反応後、薬剤は除去して抗原 (ovalbumin; 以下 OVA) のみと反応させた。阻害剤は抗酸化剤として N-acetylcystein (NAC), pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), dimethylthiourea (DMTU)、活性酸素消去剤として catalase, superoxide dismutase (SOD)、選択的酵素阻害剤として allopurinol, diphenyleneiodonium (DPI) を使用した。ミトコンドリアの活性酸素産生阻害剤として sodium azide, antimycin A, rotenone を用いた。
4. 抗原特異的 CD4+T 細胞クローン: OVA 特異的な CD4+T 細胞クローン (T-OVA) を作成し、実験に供与した。作成方法の概略は、ラットの足底に OVA を接種し、10 日後に採取したリンパ節から分離したリンパ球を OVA と抗原提示細胞で繰り返し刺激して得られた T 細胞を IL-2 で刺激した。さらに限界希釈法により OVA を認識する CD4+T 細胞クローンを作成した。抗原特異的反応をフローサイトメトリーと ^3H -thymidine 取り込み試験にて解析した。
5. 抗原提示試験: 各種薬剤で前処理を行ったクッパー細胞に OVA 取り込ませた後、T-OVA と反応させた。T 細胞増殖を ^3H -thymidine の取り込み試験により測定した。

6. クッパー細胞の過酸化水素産生測定:クッパー細胞を抗酸化剤等で前処理した後、抗原刺激を行った。過酸化水素の発生量を Amplex red を用いて蛍光マイクロプレートリーダーにて測定した。
7. フローサイトメトリーによる表面抗原の解析:OVA で処理したクッパー細胞の MHC class II(RT1B)と CD40、CD80 それぞれの発現を FACS Caliber で測定し CellQuest version 3.1 で解析した。

【 結果 】

1. クッパー細胞は OVA との反応により過酸化水素を産生した。クッパー細胞の抗原提示における MHC classII(RT1B)、costimulatory molecule (CD80)の発現は OVA の刺激に対し容量依存的に増加した。クッパー細胞は OVA 容量依存的に抗原提示にて T-OVA を増殖させた。
2. 抗酸化剤である NAC、PDTC、DMTU はいずれもクッパー細胞の OVA 抗原提示による T-OVA 増殖を抑制した。
3. 活性酸素の主な産生源となる NADPH 酸化酵素系または xanthine 酸化酵素系に対する阻害剤である DPI と allopurinol は、抗原刺激されたクッパー細胞の過酸化水素産生を相加的に抑制した。さらに両薬剤は同様にクッパー細胞の OVA 抗原提示による T-OVA 増殖に対しても相加的な抑制効果を示した。
4. ミトコンドリア電子伝達系からの活性酸素産生に対し、それぞれミトコンドリア NADH 脱水素酵素系と co-enzyme Q-cytochrome 還元酵素系の阻害剤である rotenone, antimycin A はクッパー細胞の抗原提示による T-OVA の増殖を抑制した。
5. フローサイトメトリーによる解析にて、OVA 刺激により発現が増加したクッパー細胞の MHC class II と CD40,CD80 は DPI と allopurinole の両方にて抑制された。さらに両薬剤の併用はほぼ完全にこれらの分子の発現増加を抑制した。

【 考察 】

クッパー細胞内では、抗原刺激により過酸化水素の産生が増加する。抗酸化剤や酸化酵素阻害剤は、抗原刺激により増加したクッパー細胞の MHC クラス II や補助刺激分子の発現を抑制する。さらにクッパー細胞の活性酸素産生を抑制する処理により、クッパー細胞の抗原刺激による T 細胞増殖は妨害される。また、MHC クラス II 発現の増加が、抗原提示に反応した T 細胞増殖を増幅している可能性が考えられた。これらのことから、クッパー細胞における抗原処理過程中に発生した細胞内活性酸素は、抗原提示機能のシグナル伝達に関与していると思われ、この過程において NADPH 酸化酵素系と xanthine 酸化酵素系が主要な活性酸素の供給源となっていると考えられた。クッパー細胞内での抗原処理で発生した活性酸素は、MHC 複合体や補助刺激分子の発現を増加させ、抗原提示機能を活性化させる二次伝達系として働いていると推測された。以上より、本研究によって活性酸素がクッパー細胞の抗原提示機能において重要なメディエーターとして関与していることが明らかにされた。

(Immunology and Cell Biology 83, 336-43, 2005 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	医論 第1435号	氏名	前村 公成
審査委員	主査	松山 隆美	
	副査	坪内 博仁	小田 紘

Reactive oxygen species are essential mediators in antigen presentation
by Kupffer cells
(活性酸素はクッパー細胞の抗原提示機能に必須のメディエーターである)

クッパー細胞は門脈を通じて肝に侵入する微生物や抗原を排除するだけでなく、肝内の抗原提示細胞としての機能も有している。また細胞内で発生したreactive oxygen species(ROS: 活性酸素)が様々な免疫応答に関与していることも判明している。しかし、クッパー細胞の抗原提示機能と活性酸素の関わりについてはいまだ明らかでない。本論文はラットより分離したクッパー細胞を用いて、クッパー細胞の抗原処理過程で発生した活性酸素が、クッパー細胞の抗原提示機能に不可欠な二次的伝達系として働いているという新知見について報告したものである。実験方法は論文要旨に記載のごとくである。クッパー細胞の抗原提示機能は独自に樹立したovalbumin(以下OVA)特異的なT細胞クローン(以下T_{OVA})の増殖反応を用いて測定した。得られた成績は以下のようなものであった。

- 1) クッパー細胞は抗原の刺激により用量依存的に過酸化水素を発生した。
- 2) 抗原提示におけるクッパー細胞のMHC class II、補助刺激分子 (CD80)の発現および抗原提示によるT_{OVA}の増殖は用量依存的に増加した。
- 3) クッパー細胞の抗原提示によるT_{OVA}増殖反応は、抗酸化剤および活性酸素の消去剤の処理により抑制された。
- 4) 抗原刺激されたクッパー細胞の過酸化水素産生は NADPH オキシダーゼまたはキサンチンオキシダーゼの特異的な阻害剤により抑制された。
- 5) 両薬剤はクッパー細胞の抗原提示による T_{OVA} 増殖に対しても同様に抑制効果を示した。
- 6) クッパー細胞の抗原提示機能は、ミトコンドリア電子伝達系の酵素阻害により抑制された。
- 7) 抗原刺激を受けたクッパー細胞のMHC class IIおよび補助刺激分子の発現は、ROS産生阻害により抑制された。

クッパー細胞は、取り込んだ抗原を処理しMHC複合体補助刺激分子の刺激のもと、抗原特異的なT細胞に情報を伝達することでT細胞の増殖を誘導する。クッパー細胞は大量の活性酸素を産生するが、抗原提示機能における活性酸素の役割についての知見はごく限られている。本論文においてクッパー細胞内では抗原刺激により活性酸素が発生し、同時にMHC class IIや補助刺激分子の発現増加、さらには抗原特異的なT細胞クローンを用いた実験により抗原提示によるT細胞増殖の増加が確認され、これらの反応が抗酸化剤や活性酸素の消去剤により抑制されることが実証された。しかもNADPHオキシダーゼとキサンチンオキシダーゼ系がクッパー細胞内で生じる活性酸素の供給源として重要であり、MHC class IIや補助刺激分子の発現、抗原提示機能の制御に関与していることが証明された。またミトコンドリアの電子伝達系が産生する活性酸素もクッパー細胞の抗原提示に重要であることも明らかとなった。これらのことからクッパー細胞内では抗原処理で発生した活性酸素が、MHC複合体や補助刺激分子の発現制御に関わり、抗原提示機能を活性化させる重要な二次伝達系として働いていると推測された。

以上の如く、本研究結果は活性酸素がクッパー細胞の抗原提示機能において重要な役割を持つことを明らかにしたものであり、活性酸素と免疫制御に関わる病態の解明や治療の研究をさらに推し進めるものと考えられる。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論 第1435号	氏名	前村 公成
審査委員	主査	松山 隆美	
	副査	坪内 博仁	小田 紘

主査および副査の3名は、平成18年8月7日、学位申請者 前村公成 君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下の様な質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

- (1) ROSが抗原提示に関与しているということは、ROSを抑制することで抗原のプロセッシングそのものが正常に進行していない結果なのか？
 →抗原が貪食されてその後の処理から提示までは多くの過程が関与している。本研究ではROSの抑制により抗原提示機能が低下することを示しており、ROS産生酵素の阻害実験からROSの供給源別の役割は実証したが、どの段階に最もROSが関与しているかは特定できなかった。
- (2) シグナル伝達との関連は、また補助刺激因子がどのように関わっているのか？
 →活性酸素自体がシグナル伝達に関与していることは多くの報告があり、NF- κ Bについても詳細に解析されている。NF- κ Bは活性化されてから20分程度で核内にシグナルを伝達できる機能を考えると、マクロファージが貪食の段階から多くの活性酸素を産生していることから、NF- κ Bを活性化させるに十分な刺激があり、その後のプロセスに影響を与えることは十分推測される。抗原提示機能に必須である補助刺激因子の発現にも関与していると考えている。
- (3) 他の細胞で産生されたROSはクッパー細胞の機能に影響するのか？
 →類洞の内皮細胞などはクッパー細胞と密接している解剖学的特徴から、酸化ストレス時のクッパー細胞の機能調整に関与している可能性は十分考えられる。
- (4) 肝細胞自体が起こす酸化ストレスの影響はあるのか？
 →影響は否定できない。ただしクッパー細胞が放出する活性酸素の量を考慮するとその影響は少ないと推測する。むしろ内皮細胞や周囲のリンパ球等に与える影響のほうが大きいと考える。
- (5) ROSがクッパー細胞の抗原提示機能に関与していることが、疾患の治療や免疫寛容にどのように結びつくのか？
 →近年の研究ではクッパー細胞が抑制性のマクロファージとして機能している点などが注目されており、免疫寛容の調整や、癌細胞の制御に役立つ可能性が指摘されている。また爆発的な酸化ストレスを発生するクッパー細胞は常に内皮細胞による制御を受けていると考えられ、両者の細胞の相互作用に関わる活性酸素を調節できれば、たとえば移植における拒絶といった病態の制御に応用できるのではないかとと思われる。
- (6) 抗原提示に関して樹状細胞の働きとクッパー細胞の働きは、たとえばウイルスの排除などに関連して、どちらが有用と考えられているのか？
 →両者は肝内における解剖学的な分布が異なっている。樹状細胞は非常に強い抗原提示機能を有しており、肝内のT細胞の制御に大変重要である。一方、クッパー細胞の抗原提示能力は低いものの肝内の細胞数としては相当の割合を占めていることから、両者はそれぞれ違う働きを分担しているものとする。ウイルス排除にどちらが重要なのかは明確になっていない。

- (7) 実験で使用したクッパー細胞は正常の状態で使用したものか？
→正常のラットより分離したもので、生体への刺激は全く行っていない。
- (8) タンパクの取り込みであるpinocytosisで起こった現象と考えてよいのか？
→酸化ストレスは食作用後の殺菌作用が強力であるが、pinocytosisもペプチドの分解にNADPHオキシダーゼからの活性酸素が作用している。
- (9) この実験では、T細胞が抗原であるOVAのレセプターを有していた場合にこれらの反応がaccelerateされるということか？
→OVAといったペプチドであっても活性酸素の発生は確認された。活性酸素の調節で抗原特異的なT細胞の増殖が制御されたことより、抗原提示に活性酸素が重要であると考えた。
- (10) 通常pHが低下し、プロテオグリカンからプロテアーゼが放出されてタンパクを分解するが、活性酸素を抑制することでこの過程が阻害されて、結果的に抗原提示能が減弱すると考えているのか？
→NADPHオキシダーゼの活性酸素は水素イオンを介して食胞のpHを調整している。NADPHオキシダーゼの阻害によりペプチドの分解は阻害されると考えられ、抗原は処理されず、抗原提示も抑制されると説明できる。ただし活性酸素はミトコンドリアの電子伝達経路からも発生しており、本研究で抗原提示に関与していることも実証されていることから、活性酸素はより複雑に影響していると思われる。
- (11) 活性酸素の抑制によりMHC class IIやcostimulatorが減弱する意味は？
→活性酸素が抗原提示に関わるメカニズムのひとつであると考えている。
- (12) OVAとエピトープを作るペプチドの発現が細胞表面で測定可能であれば、より明確に説明できるのではないか？
→その可能性は十分ある。
- (13) H₂O₂の測定系は細胞外の測定であり細胞内産生の測定となっていないが、両者はパラレルと考えてよいのか？
→活性酸素の発生源の組織学的分布と特性を考えると、細胞外での測定は細胞内で産生されている量とその変動を捉えているものと判断してよいと考えている。
- (14) OVAのようなものが入り込まれたときにROSが産生されることは新しい知見なのか？
→飲作用もエンドサイトーシスのひとつであり、食胞内でペプチドが分解されるときにNADPHオキシダーゼからの活性酸素が重要な役割を演じていることはすでに知られており、参考にした文献を含めて新しい知見と考えられる点はなかった。
- (15) 実験の中ではROSの抑制によりクッパー細胞の抗原提示機能を強力に抑制している結果が得られているが、ROSの関与が抗原提示における最も主要なメカニズムなのか？
→NADPHオキシダーゼとキサンチンオキシダーゼは活性酸素の最も重要な供給源であるが、この系を抑制することは細胞内のその他様々な生理的な機能を低下させる可能性は十分考えられる。結果的に抗原提示機能の著明な低下を引き起こしているのではないかと推測する。活性酸素は抗原の処理から提示およびT細胞の刺激までの過程に密接に関与しているが、この研究ではどのシステムに影響しているかを同定するにはいたらず、今後の課題のひとつと考える。
- (16) 臨床的に用いられるグルタチオンはどのように関わると考えられるのか？
→細胞内では酸化されたグルタチオンはNADPHと反応して還元されることより抗酸化剤として知られているが、投与された薬剤の細胞内での動態は不明であり抗原提示機能に関する役割は明らかになっていない。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。