

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
松谷 崇弘	主査 教授 上 田 晃 一
	副査 教授 田 窪 孝 行
	副査 教授 大 槻 勝 紀
	副査 教授 清 金 公 裕
	副査 教授 窪 田 隆 裕
主論文題名 Plasmacytoid dendritic cells employ multiple cell adhesion molecules sequentially to interact with high endothelial venule cells - molecular basis of their trafficking to lymph nodes (高内皮細静脈との相互作用において形質細胞様樹状細胞は多くの接着分子を逐次的に用いる - リンパ節へのトラフィックングにおける分子的基礎)	
学位論文内容の要旨	
《研究目的》 抗ウイルス免疫反応において形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid Dendritic Cell; pDC) は、ウイルス増殖を直接抑制し、また I 型のインターフェロンを産生することにより NK 細胞、T 細胞、B 細胞や従来の樹状細胞の活性化に貢献する。この pDC は定常時でもリンパ節内に存在するが、L-selectin 欠損マウスではリンパ節内の pDC 数が減少する。このことから高内皮細静脈 (High Endothelial Venule: HEV) を介したリンパ節内への pDC の移住は、少なくとも一部は L-selectin に依存していると言われている。しかし pDC のリンパ節内への移住に必要とされる接着分子に関する研究は、現在のところ十分ではない。なぜなら、炎症刺激を加えていないマウス由来の pDC を十分量得ることは困難であるため <i>in vitro</i> もしくは <i>in vivo</i> で人工的に増殖された pDC を用いた研究が多いからである。すなわち非炎症時における pDC のリンパ節内への移住を制御する分子機構に関する有用な情報はないと言える。そこでわれわれは pDC をリンパ節へ動員する分子機構を解析するために pDC と HEV 内皮細胞を定常時のマウス生体内から精製し、両者の相互作用を <i>in vitro</i> で観察した。 《方 法》 ①HEV 内皮細胞・pDC の精製 マウスから脾臓および腸間膜リンパ節を摘出し collagenase 及び trypsin 処理をした後、pDC もしくは HEV 内皮細胞特異的抗体を反応させ、そこにマグネットビーズをつけ、磁気ビーズ法にて pDC および HEV 内皮細胞を精製した。また non-HEV 内皮細胞は CD34 ⁺ PNAd ⁻ MAdCAM-1 ⁻ 内皮細胞を FACS Aria を用いて精製した。 ②pDC の接着と潜り込み実験 精製した HEV 内皮細胞を collagen I コートした chamber slide 上にて 37°C で 2 時間培養した後、精製した pDC を添加し、更に 37°C で 3 時間共に培養した。得られた標本を PFA 固定後 May-Grunwald-Giemsa 染色することで HEV に接着・潜り込んだ pDC を光学顕微鏡で観察し定量化した。また αL integrin, α4 integrin, ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, JAM-A を用いた抗体阻害実験を行った。pDC をあらかじめ pertussis toxin (PTX) 処理する際は、様々な濃度で 37°C 1 時間反応させた。	

《結果》

pDC は HEV 内皮細胞に接着し、またその下面に潜り込む能力があり、そして特異的な接着分子対を用いた連続性を介して HEV と相互作用することを初めて示した。pDC は HEV 内皮細胞下面には潜り込むが、non-HEV 内皮細胞には潜り込まなかった。このことから、少なくとも pDC の HEV 内皮細胞への潜り込みには、特異的な制御機構が存在することが示唆された。更に pDC の潜り込みにおいて LFA-1 と JAM-A との関わりを初めて示した。

《考察》

pDC は自然免疫と獲得免疫応答の場であるリンパ組織で I 型インターフェロンを産生する。この pDC は血管から HEV を介してリンパ節内に移住するとされているが、その機序に関しては不明な点が多い。そこで pDC のリンパ節動員の分子機構を解析するために pDC と HEV 内皮細胞をマウス生体内から精製し、両者の相互作用を *in vitro* で観察した。共培養した pDC は HEV 内皮細胞に接着し、その後 HEV 内皮細胞下面に潜り込んだ。pDC をあらかじめ PTX 処理すると、HEV 内皮細胞への接着は抑制されなかったが、潜り込みが抑制された。また HEV 内皮細胞の代わりに non-HEV 内皮細胞を用いた場合、pDC の接着は認められたが潜り込みは認められなかった。これらの所見から、接着と潜り込みは別々に制御されていることが明らかになった。

抗体阻害実験からは pDC 上の α L integrin, α 4 integrin と HEV 上の ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 が pDC の接着および潜り込みに関与し、また α L integrin のリガンドとして働く JAM-A が pDC の潜り込みに選択的に関与することが明らかになった。これらのデータから、HEV を介する接着と潜り込みの過程において、pDC は多くの接着分子を逐次的に用いることが初めて明らかとなった。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	松谷 崇弘
論文審査担当者		主査 教授 上 田 晃 一	
		副査 教授 田 窪 孝 行	
		副査 教授 大 槻 勝 紀	
		副査 教授 清 金 公 裕	
		副査 教授 窪 田 隆 裕	
主論文題名			
<p>Plasmacytoid dendritic cells employ multiple cell adhesion molecules sequentially to interact with high endothelial venule cells - molecular basis of their trafficking to lymph nodes (高内皮細静脈との相互作用において形質細胞様樹状細胞は多くの接着分子を逐次的に用いる - リンパ節へのトラフィックキングにおける分子的基礎)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>血中からリンパ節へと循環する形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid Dendritic Cell; pDC)のトラフィックキングは、炎症刺激によって惹起されるという考えが一般的であった。しかし、本研究から pDC は定常時においても高内皮細静脈(High Endothelial Venule: HEV)内皮細胞と相互作用する能力を持ち、T・Bリンパ球と同様の機序を用いてリンパ節に移住する可能性が強く示唆された。pDC は HEV 内皮細胞に接着することで内皮細胞の形態的変化を惹起し、次に内皮細胞下面に潜り込む。</p> <p>現在、生体顕微鏡技術を用いて pDC の血管外遊走の過程を連続して観察することは技術的に困難であることから、本研究において新しく開発された <i>in vitro</i> 実験モデルは、pDC の血管外遊走の過程を解析する新しいツールになると考えられる。</p> <p>本研究では、定常時における pDC と HEV との相互作用において pDC 上の αL integrin, α4 integrin と HEV 上の ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 が接着および潜り込みに関与し、また αL integrin のリガンドとして働く JAM-A が潜り込みにおいて選択的に関与することが明らかになった。これらのデータは、主に接着に関わる分子と遊走に関わる分子の制御機構への新知見を示すものであり、基礎医学に貢献するところが大きいと考えられる。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第9条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p>			
(主論文公表誌)			
International Immunology 19(9): 1031-1037, 2007			